



ORGANISATION MONDIALE
DE LA SANTÉ ANIMALE

**MANUEL DES TESTS DE DIAGNOSTIC ET DES
VACCINS POUR LES ANIMAUX TERRESTRES
(mammifères, oiseaux et abeilles)**

**Sixième Édition
Volume 1**

2008

Ce Manuel terrestre a été édité
par la Commission des normes biologiques et adopté
par l'Assemblée mondiale des Délégués de l'OIE

La mention de kits de diagnostic commerciaux ne signifie pas que ceux-ci sont recommandés ou soutenus par l'OIE. Tous les kits de diagnostic commerciaux doivent être validés, ceux inclus dans le Registre OIE l'ont été (le Registre peut être consulté sur le site de l'OIE, www.oie.int).

Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE
Sixième Édition, 2008

Manual of Recommended Diagnostic Techniques and Requirements for Biological Products:
Volume I, 1989; Volume II, 1990; Volume III, 1991.

Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines:

Seconde Édition, 1992

Troisième Édition, 1996

Quatrième Édition, 2000

Cinquième Édition, 2004

Vol. 1 et 2 : ISBN 978-92-9044-752-8

Vol. 1 : ISBN 978-92-9044-753-5

© Copyright
Organisation mondiale de la santé animale, 2009
12, rue de Prony, 75017 Paris, FRANCE
Téléphone: 33-(0)1 44 15 18 88
Fax: 33-(0)1 42 67 09 87
Courrier électronique : oie@oie.int
<http://www.oie.int>

Toutes les publications de l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale) sont protégées par le copyright international. La copie, la reproduction, la traduction, l'adaptation ou la publication d'extraits, dans des journaux, des documents, des ouvrages ou des supports électroniques et tous autres supports destinés au public, à des fins d'information, didactiques ou commerciales, requièrent l'obtention préalable d'une autorisation écrite de l'OIE.

Les désignations et dénominations utilisées et la présentation des données figurant dans cette publication ne reflètent aucune prise de position de l'OIE quant au statut légal de quelque pays, territoire, ville ou zone que ce soit, à leurs autorités, aux délimitations de leur territoire ou au tracé de leurs frontières.

AVANT-PROPOS

Le *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres (Manuel terrestre)* a pour objectifs de faciliter le commerce international des animaux et des produits d'origine animale et de contribuer à l'amélioration des services zoosanitaires dans le monde. Les lecteurs ciblés sont principalement les personnels des laboratoires de médecine vétérinaire réalisant des tests de diagnostic et une surveillance épidémiologique, mais également les fabricants de vaccins et les autorités réglementaires des Pays et Territoires Membres de l'OIE. L'objectif est de fournir les méthodes de diagnostic utilisées en laboratoire et acceptées à l'échelle internationale et également les spécifications pour la production et le contrôle des vaccins et des autres produits biologiques.

Cet objectif ambitieux a nécessité la coopération de spécialistes de grande renommée en santé animale provenant de nombreux pays. L'OIE, Organisation mondiale de la santé animale, est de toute évidence l'institution la mieux placée pour accomplir cette tâche au niveau mondial. Les principales activités de l'organisation, qui a été fondée en 1924 et comptait en 2009 174 Membres, sont les suivantes :

1. Assurer la transparence en ce qui concerne la situation mondiale en matière de maladies animales et de zoonoses,
2. Collecter, analyser et diffuser les informations scientifiques vétérinaires sur les méthodes de lutte des maladies animales,
3. Offrir une expertise et encourager la solidarité internationale dans la lutte contre les maladies animales,
4. Dans le cadre de son mandat en vertu de l'Accord relatif aux mesures sanitaires et phytosanitaires (Accord SPS) de l'OMC (Organisation mondiale du commerce), sécuriser le commerce international en publiant des normes sanitaires pour le commerce international des animaux et des produits d'origine animale,
5. Améliorer le cadre juridique et les ressources des Services vétérinaires nationaux,
6. Offrir une meilleure garantie pour la sécurité sanitaire des aliments d'origine animale et promouvoir le bien-être animal par une démarche fondée sur des bases scientifiques.

Le *Manuel terrestre*, qui couvre les maladies infectieuses et parasitaires des mammifères, oiseaux et abeilles, a été publié pour la première fois en 1989. Chaque édition successive a étendu et actualisé les informations fournies. Cette sixième édition comprend de nouveaux chapitres sur les lignes directrices pour les normes internationales applicables aux banques de vaccins, à la Rhinotrachéite infectieuse de la dinde (metapneumovirus aviaires), au petit coléoptère de la ruche (*Aethina tumida*) et à la variole des camélidés, tandis que *Mycoplasma synoviae* a été ajouté au chapitre sur la mycoplasmosse aviaire (dans la précédente édition, le chapitre ne portait que sur *Mycoplasma gallisepticum*). En tant que complément du *Code sanitaire pour les animaux terrestres*, le *Manuel terrestre* fixe les normes de laboratoire pour toutes les maladies listées par l'OIE et également pour d'autres maladies d'importance mondiale. Il mentionne en particulier (police bleue) les épreuves dites « prescrites » dont l'utilisation est recommandée pour le dépistage des maladies dans le cadre du commerce international ou du mouvement des animaux.

Le *Manuel terrestre* est très largement adopté comme ouvrage de référence par les laboratoires vétérinaires du monde entier. Les maladies des animaux aquatiques sont traitées à part dans le *Manuel aquatique*.

La tâche qui consistait à répartir la rédaction des chapitres et à compiler le *Manuel terrestre* a été confiée à la Commission des normes biologiques par l'Assemblée mondiale des Délégués nationaux des Membres de l'OIE. Les manuscrits ont été rédigés par des spécialistes de chacune des maladies ou questions traitées. Après un premier examen, par le Rédacteur technique consultant, les chapitres ont été adressés à des relecteurs scientifiques et à des experts des Laboratoires de référence de l'OIE. Ils ont aussi été diffusés à tous les Délégués des Membres de l'OIE pour examen et commentaires. La Commission des normes biologiques et le Rédacteur technique consultant ont pris en compte tous les commentaires reçus, les renvoyant souvent aux

auteurs pour avis avant d'établir la version définitive. Le texte final a reçu l'approbation de l'Assemblée mondiale des Délégués de l'OIE.

Une procédure, qui est sous l'autorité de l'Assemblée mondiale des Délégués, a été finalisée en septembre 2004 pour la reconnaissance officielle des kits de diagnostic commercialisés. Les données sont soumises en suivant un modèle développé par la Commission des normes biologiques. Les dossiers ainsi soumis sont évalués par des experts, choisis pour leur excellence, qui ont pour rôle de conseiller la Commission des normes biologiques avant que cette dernière ne soumette à l'Assemblée mondiale des Délégués pour décision finale le kit de diagnostic. Toutes les informations relatives à la soumission de dossiers peuvent être trouvées sur le site internet de l'OIE.

Le *Manuel terrestre* continue de développer et d'étendre le champ des sujets couverts. Nous espérons sincèrement qu'il sera encore plus utile pour les spécialistes du diagnostic vétérinaire et les fabricants de vaccins dans tous les Pays et Territoires Membres de l'OIE. L'édition papier du *Manuel terrestre* est publiée tous les 4 ans. Il est important de noter que toutes les mises à jour annuelles du *Manuel terrestre* seront publiées sur le site internet de l'OIE dès qu'elles ont été adoptées par l'Assemblée mondiale des Délégués. Les lecteurs sont donc invités à vérifier sur ce site les informations les plus récentes. Le *Manuel terrestre* est publié en Anglais, Espagnol et Français.

Docteur Bernard Vallat
Directeur général, OIE

Professeur Steven Edwards
Président, Commission des normes biologiques
de l'OIE

Janvier 2009

REMERCIEMENTS

J'exprime ma profonde gratitude aux nombreuses personnes dont les efforts conjugués ont permis la préparation de ce *Manuel terrestre*. Je voudrais remercier tout particulièrement :

Le Docteur Bernard Vallat, Directeur général de l'OIE depuis 2001, qui a encouragé et soutenu le projet de cette nouvelle édition du *Manuel terrestre*,

Les Membres de la Commission des normes biologiques de l'OIE, le Professeur Steven Edwards, la Docteure Beverly Schmitt, le Docteur Anatoly Golovko, le Docteur Mehdi El Harrak et le Docteur Santanu K. Bandhopadhyay qui ont eu la responsabilité de confier les chapitres et, avec le Rédacteur technique consultant, d'éditer toutes les contributions afin d'arrêter la version définitive de la présente édition du *Manuel terrestre*,

Les collaborateurs dont les noms figurent aux pages allant de xxv à xxxviii qui ont consacré leur temps précieux et leur compétence inestimable à l'écriture des chapitres,

Le Docteur Adama Diallo et le Docteur Peter Wright, qui ont agi comme experts conseillers lors des réunions de la Commission des normes biologiques, les experts des Laboratoires de référence de l'OIE et les autres relecteurs qui ont aussi donné leur temps et leur compétence à l'examen des chapitres,

Les Délégués des Membres de l'OIE qui ont soumis des commentaires sur les projets de chapitres qui leur ont été adressés. Ces commentaires ont joué un rôle essentiel pour la reconnaissance internationale du *Manuel terrestre*,

Madame Sara Linnane qui, en tant que Rédactrice scientifique, a organisé ce projet complexe et apporté des contributions essentielles à la qualité du texte,

Le Docteur James E. Pearson, Rédacteur technique consultant du *Manuel terrestre*, qui a contribué grandement à l'édition et à l'harmonisation du contenu, mais aussi à la collecte et l'incorporation des commentaires provenant des Délégués des Membres de l'OIE,

Les agents du Service scientifique et technique et du Service des publications de l'OIE pour leur assistance.

Docteur Barry O'Neill
Président de l'Assemblée mondiale des Délégués
de l'OIE

Janvier 2009

REMERCIEMENTS POUR L'ÉDITION FRANÇAISE

J'exprime ma profonde gratitude aux nombreuses personnes qui ont permis la publication de cette seconde édition en français du *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres*. Je voudrais remercier tout particulièrement :

Le Docteur Bernard Vallat, Directeur général de l'OIE depuis 2001, qui a encouragé et soutenu ce projet si important pour les vétérinaires, techniciens et experts des pays francophones,

Les Docteurs Elisabeth et Pascal Boireau pour avoir réalisé la première traduction en français du *Manuel terrestre* (édition de 1996),

Les experts francophones en sciences vétérinaires, dont les noms figurent aux pages allant de xxxix à xlii, qui ont consacré un temps précieux et leurs compétences reconnues à la traduction des chapitres en français à partir de la version anglaise de la 5^e édition du *Manuel terrestre* (2004),

Le Docteur Pierre-Charles Lefèvre qui a consacré beaucoup de son temps et de son énergie à la traduction des mises à jour pour l'ensemble de ces chapitres, en mettant à profit ses grandes connaissances scientifiques et son expérience dans la publication d'ouvrages scientifiques,

Les agents du Service scientifique et technique et du Service des publications pour leur assistance.

Docteur Carlos A. Correa Messuti
Président de l'Assemblée mondiale des Délégués
de l'OIE

Juin 2009

TABLE DES MATIÈRES

VOLUME 1

Introduction (Comment utiliser ce <i>Manuel terrestre</i>).....	XI
Liste des tests pour les échanges internationaux.....	XIII
Abréviations usuelles utilisées dans ce <i>Manuel terrestre</i>	XVII
Glossaire des termes.....	XIX
Contributeurs.....	XXV
Contributeurs à l'édition française.....	XXXIX

PARTIE 1 INFORMATION GÉNÉRALE

SECTION 1.1. CHAPITRES INTRODUCTIFS

Chapitre 1.1.1.	Prélèvement et expédition des échantillons pour le diagnostic.....	3
Chapitre 1.1.2.	Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries.....	16
Chapitre 1.1.3.	Gestion de la qualité dans les laboratoires de diagnostic vétérinaire.....	29
Chapitre 1.1.4.	Principes de la validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses...	37
Chapitre 1.1.5.	Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses.....	50
Chapitre 1.1.6.	Méthodes de laboratoire utilisées pour les essais d'antibiorésistance	61
Chapitre 1.1.7.	Les biotechnologies dans le diagnostic des maladies infectieuses et le développement des vaccins.....	72
Chapitre 1.1.8.	Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire.....	99
Chapitre 1.1.9.	Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques.....	116
Chapitre 1.1.10.	Lignes directrices pour les normes internationales applicables aux banques de vaccins.....	127
Chapitre 1.1.11.	Rôle des autorités officielles dans la réglementation internationale des produits biologiques à usage vétérinaire.....	132

PARTIE 2 MALADIES LISTÉES PAR L'OIE ET AUTRES MALADIES AYANT UNE IMPORTANCE POUR LES ÉCHANGES INTERNATIONAUX

SECTION 2.1. MULTI-ESPÈCES

Chapitre 2.1.1.	Fièvre charbonneuse.....	147
Chapitre 2.1.2.	Maladie d'Aujeszky.....	157
Chapitre 2.1.3.	Fièvre catarrhale du mouton.....	172
Chapitre 2.1.4.	Echinococcose/hydatidose.....	191
Chapitre 2.1.5.	Fièvre aphteuse.....	207
Chapitre 2.1.6.	Cowdriose.....	238
Chapitre 2.1.7.	Encéphalite japonaise.....	253
Chapitre 2.1.8.	Leishmaniose.....	263
Chapitre 2.1.9.	Leptospirose.....	275
Chapitre 2.1.10.	Myiase à <i>Cochliomyia hominivorax</i> et Myiase à <i>Chrysomya bezziana</i>	290
Chapitre 2.1.11.	Paratuberculose (maladie de Johnne).....	302
Chapitre 2.1.12.	Fièvre Q.....	319
Chapitre 2.1.13.	Rage.....	333

Chapitre 2.1.14.	Fièvre de la Vallée du Rift.....	353
Chapitre 2.1.15.	Peste bovine.....	365
Chapitre 2.1.16.	Trichinellose.....	376
Chapitre 2.1.17.	Infections à <i>Trypanosoma evansi</i> (y compris le Surra)	386
Chapitre 2.1.18.	Tularémie.....	396
Chapitre 2.1.19.	Stomatite vésiculeuse.....	403
Chapitre 2.1.20.	Fièvre de West Nile.....	414
SECTION 2.2.	APIDAE	
	Note d'introduction sur les maladies des abeilles.....	425
Chapitre 2.2.1.	Acarapisose des abeilles mellifères.....	426
Chapitre 2.2.2.	Loque américaine des abeilles mellifères.....	433
Chapitre 2.2.3.	Loque européenne des abeilles mellifères.....	443
Chapitre 2.2.4.	Nosémose des abeilles mellifères.....	448
Chapitre 2.2.5.	Infestation par le petit coléoptère des ruches (<i>Aethina tumida</i>).....	454
Chapitre 2.2.6.	Infestation des abeilles mellifères par <i>Tropilaelaps</i> (<i>Tropilaelaps</i> spp.).....	458
Chapitre 2.2.7.	Varroose des abeilles mellifères	463
SECTION 2.3.	AVES	
Chapitre 2.3.1.	Chlamydiose aviaire.....	469
Chapitre 2.3.2.	Bronchite infectieuse aviaire.....	482
Chapitre 2.3.3.	Laryngotrachéite infectieuse aviaire.....	496
Chapitre 2.3.4.	Influenza aviaire.....	506
Chapitre 2.3.5.	Mycoplasmoses aviaires (<i>Mycoplasma gallisepticum</i> , <i>M. synoviae</i>).....	525
Chapitre 2.3.6.	Tuberculose aviaire.....	542
Chapitre 2.3.7.	Peste du canard.....	553
Chapitre 2.3.8.	Hépatite virale du canard.....	561
Chapitre 2.3.9.	Choléra aviaire	571
Chapitre 2.3.10.	Variole aviaire.....	579
Chapitre 2.3.11.	Typhose et Pullorose.....	587
Chapitre 2.3.12.	Bursite infectieuse (Maladie de Gumboro).....	599
Chapitre 2.3.13.	Maladie de Marek.....	618
Chapitre 2.3.14.	Maladie de Newcastle.....	629
Chapitre 2.3.15.	Rhinotrachéite infectieuse de la dinde (metapneumovirus aviaires)	645

INTRODUCTION

(COMMENT UTILISER CE MANUEL TERRESTRE)

- **Organisation du *Manuel terrestre* et système de numérotation**

Partie 1, le début du *Manuel terrestre* contient onze chapitres introductifs qui traitent divers sujets présentant un intérêt pour les spécialistes du diagnostic des laboratoires vétérinaires. Ces chapitres visent à présenter brièvement leur sujet. Il faut les considérer comme des informations générales et non comme des normes.

La partie principale du *Manuel terrestre* (Partie 2) couvre les normes applicables aux épreuves de diagnostic et aux vaccins pour les maladies inscrites sur les listes du *Code sanitaire pour les animaux terrestres* (*Code terrestre*) de l'OIE. Dans la version anglaise, les maladies sont réparties par espèces animales hôtes et dans chacune de ces parties classées par ordre alphabétique. La version française suit le classement anglais. Les maladies listées par l'OIE sont des maladies transmissibles qui ont un potentiel de diffusion très grave et rapide à l'intérieur comme au-delà des frontières des pays. Elles ont des conséquences particulièrement graves pour l'économie et la santé publique et exercent une influence majeure sur le commerce international des animaux et des produits d'origine animale.

Quatre maladies de la Section 2.9. figurent également dans des sections consacrées à une espèce en particulier, mais ces chapitres couvrent plusieurs espèces et donnent ainsi une description plus générale. Certaines maladies supplémentaires qui sont susceptibles d'influencer le commerce mais ne font pas l'objet d'un chapitre du *Code terrestre* sont incluses dans la section 2.9.

La liste des contributeurs de tous les chapitres figure aux pages xxv–xxxviii, mais la responsabilité finale du contenu du *Manuel terrestre* incombe à l'Assemblée mondiale des Délégués de l'OIE.

On trouvera l'index alphabétique des maladies à la fin du volume 2.

- **Format des chapitres**

Chaque chapitre consacré à une maladie comporte un résumé destiné à fournir des informations aux responsables vétérinaires et aux autres lecteurs qui ont besoin d'un aperçu des épreuves et des vaccins disponibles pour la maladie en question. Il est suivi d'un texte qui donne plus de détails pour le personnel de laboratoire. Dans chaque chapitre, la partie A présente une introduction générale de la maladie. La partie B traite du diagnostic au laboratoire pour la maladie et la partie C, dans les cas appropriés, des exigences concernant les vaccins ou les produits biologiques de diagnostic *in vivo*. Les informations concernant la production et le contrôle des vaccins ou des produits de diagnostic sont données à titre d'exemple : il n'est pas toujours nécessaire de les suivre quand il existe des raisons scientifiquement justifiables pour adopter d'autres démarches. On trouvera à la fin de chaque chapitre des références bibliographiques qui donnent des renseignements supplémentaires.

- **Explication des épreuves décrites et du tableau des pages XIII–XVI**

Le tableau des pages XIII–XVI classe les épreuves de diagnostic en deux catégories : « prescrites » et de « substitution ». Les épreuves prescrites sont celles qui sont requises par le *Code terrestre* pour déterminer l'état sanitaire des animaux avant un transport international. Dans le *Manuel terrestre* ces épreuves sont imprimées en bleu. Il n'est pas possible actuellement de disposer d'épreuves prescrites pour toutes les maladies listées. Les épreuves de substitution sont celles qui conviennent au diagnostic d'une maladie dans un cadre local et elles peuvent aussi être utilisées pour l'importation/l'exportation d'animaux après un accord bilatéral. Les chapitres contiennent

souvent d'autres épreuves, qui peuvent avoir une utilité technique dans certaines circonstances locales ou qui sont peut-être en cours de développement.

- **Liste des Laboratoires de référence de l'OIE**

La liste des Laboratoires de référence de l'OIE est donnée dans la partie 3 de ce *Manuel terrestre*. Ces laboratoires ont été reconnus par l'OIE en tant que centres d'excellence possédant une expertise dans un domaine donné. Ils peuvent fournir des avis sur la méthodologie aux autres laboratoires. Dans certains cas on peut aussi obtenir auprès d'eux des souches de microorganismes ou des réactifs de référence (par exemple des antisérums, des antigènes).

La liste des Laboratoires de référence de l'OIE sera mise à jour tous les ans par l'Assemblée mondiale des Délégués de l'OIE. La liste révisée est disponible sur le site web de l'OIE.

*
* *

LISTE DES ÉPREUVES PRESCRITES POUR LES ÉCHANGES INTERNATIONAUX

Le tableau ci-dessous scinde les épreuves de diagnostic en deux catégories : « épreuves prescrites » et « épreuves de substitution ». Les épreuves prescrites sont celles qui, en vertu du *Code sanitaire pour les animaux terrestres (Code terrestre)* de l'OIE, sont utilisées lors des déplacements internationaux d'animaux et de produits d'origine animale et sont considérées comme les mieux adaptées pour la détermination du statut sanitaire des animaux. Dans le *Manuel terrestre*, ces épreuves apparaissent en bleu. Actuellement, il n'est pas possible de disposer d'épreuves prescrites pour chacune des maladies listées. Les épreuves de substitution sont adaptées au diagnostic d'une maladie dans un cadre local, bien qu'elles soient susceptibles d'être utilisées lors de l'importation ou de l'exportation d'animaux à l'issue d'une convention bilatérale. Par ailleurs, les chapitres contiennent souvent la description d'autres épreuves présentant un intérêt pratique dans certaines circonstances locales ou des tests en cours d'élaboration.

Chapitre No.	Nom de la maladie	Épreuves prescrites	Épreuves de substitution
2.1.1.	Fièvre charbonneuse	–	–
2.1.2.	Maladie d'Aujeszky	ELISA, SN	–
2.1.3.	Fièvre catarrhale du mouton	Id. agent, IDG, ELISA, PCR	SN
2.1.4.	Echinococcose/hydatidose	–	–
2.1.5.	Fièvre aphteuse	ELISA*, SN	FC
2.1.6.	Cowdriose	–	ELISA, IFI
2.1.7.	Encéphalite japonaise	–	–
2.1.8.	Leishmaniose	–	Id. agent
2.1.9.	Leptospirose	–	MAT
2.1.10.	Myiase à <i>Cochliomyia hominivorax</i> et Myiase à <i>Chrysomya bezziana</i>	–	Id. agent
2.1.11.	Paratuberculose (maladie de Johne)	–	DTH, ELISA
2.1.12.	Fièvre Q	–	FC
2.1.13.	Rage	ELISA, SN	–
2.1.14.	Fièvre de la Vallée du Rift	SN	ELISA, IHA
2.1.15.	Peste bovine	ELISA	SN
2.1.16.	Trichinellose	Id. agent	ELISA
2.1.17.	Infections à <i>Trypanosoma evansi</i> (y compris le Surra)	–	–
2.1.18.	Tularémie	–	Id. agent
2.1.19.	Stomatite vésiculeuse	FC, ELISA, SN	–
2.1.20.	Fièvre de West Nile	–	–
2.2.1.	Acarapisose des abeilles mellifères	–	–
2.2.2.	Loque américaine des abeilles mellifères	–	–

* Veuillez vous reporter aux chapitres du *Manuel terrestre* pour vérifier la nature de la méthode prescrite.

Chapitre No.	Nom de la maladie	Épreuves prescrites	Épreuves de substitution
2.2.3.	Loque européenne des abeilles mellifères	–	–
2.2.4.	Nosémose des abeilles mellifères	–	–
2.2.5.	Infestation par le petit coléoptère des ruches (<i>Aethina tumida</i>)	–	–
2.2.6.	Infestation des abeilles mellifères par <i>Tropilaelaps</i> (<i>Tropilaelaps</i> spp.)	–	–
2.2.7.	Varroose des abeilles mellifères	–	–
2.3.1.	Chlamydiose aviaire	–	–
2.3.2.	Bronchite infectieuse aviaire	–	ELISA, IHA, SN
2.3.3.	Laryngotrachéite infectieuse aviaire	–	IDG, ELISA, SN
2.3.4.	Influenza aviaire	Isolement du virus avec test de pathogénicité	IDG, IHA
2.3.5.	Mycoplasmosse aviaire (<i>Mycoplasma gallisepticum</i> , <i>M. synoviae</i>)		Agg., IHA
2.3.6.	Tuberculose aviaire		Id. agent, Test à la tuberculine
2.3.7.	Peste du canard	–	–
2.3.8.	Hépatite virale du canard	–	–
2.3.9.	Choléra aviaire	–	–
2.3.10.	Variole aviaire	–	–
2.3.11.	Typhose et Pullorose	–	Id. agent, Agg.
2.3.12.	Bursite infectieuse (Maladie de Gumboro)	–	IDG, ELISA
2.3.13.	Maladie de Marek	–	IDG
2.3.14.	Maladie de Newcastle	–	IHA
2.3.15.	Rhinotrachéite infectieuse de la dinde (metapneumovirus aviaires)	–	–
2.4.1.	Anaplasmosse bovine	–	CAT, FC
2.4.2.	Babésiose bovine	–	FC, ELISA, IFI
2.4.3.	Brucellose bovine	BBAT, FC, ELISA, EPF	–
2.4.4.	Cysticercose bovine	–	Id. agent
2.4.5.	Campylobactériose génitale bovine	Id. agent	–
2.4.6.	Encéphalopathie spongiforme bovine	–	–
2.4.7.	Tuberculose bovine	Test à la tuberculine	Test aux interférons gamma
2.4.8.	Diarrhée virale bovine	Id. agent	–
2.4.9.	Péripneumonie contagieuse bovine	FC, ELISA	–
2.4.10.	Dermatophilose	–	–
2.4.11.	Leucose bovine enzootique	IDG, ELISA	PCR
2.4.12.	Sépticémie hémorragique	–	Id. agent
2.4.13.	Rhinotrachéite infectieuse bovine/Vulvovaginite pustuleuse infectieuse	Id. agent (seulement pour la semence), ELISA, PCR, SN	–
2.4.14.	Dermatose nodulaire contagieuse	–	SN
2.4.15.	Coryza gangréneux	–	IFI, PCR, SN
2.4.16.	Theilériose	Id. agent, IFI	–
2.4.17.	Trichomonose	Id. agent	Agg. Mucus

Chapitre No.	Nom de la maladie	Épreuves prescrites	Épreuves de substitution
2.4.18.	Trypanosomes (transmises par les tsé-tsé)	–	IFI
2.5.1.	Peste équine	FC, ELISA	Id. agent (PCR en temps réel), SN
2.5.2.	Métrite contagieuse équine	Id. agent	–
2.5.3.	Dourine	FC	ELISA, IFI
2.5.4.	Lymphangite épizootique	–	–
2.5.5.	Encéphalomyélite équine (de l'Est et de l'Ouest)	–	FC, IHA, PRN
2.5.6.	Anémie infectieuse des équidés	IDG	ELISA
2.5.7.	Grippe équine	–	IHA
2.5.8.	Piroplasmoses équines	ELISA, IFI	FC
2.5.9.	Rhinopneumonie équine	–	SN
2.5.10.	Artérite virale équine	Id. agent (seulement pour la semence), SN	–
2.5.11.	Morve	FC, Test à la malléine	–
2.5.12.	Gale des équidés	–	Id. agent
2.5.13.	Variole équine	–	–
2.5.14.	Encéphalomyélite équine vénézuélienne	–	FC, IHA, PRN
2.6.1.	Myxomatose	–	IDG, FC, IFI
2.6.2.	Maladie hémorragique du lapin	–	IHA
2.7.1.	Maladie de la frontière	Id. agent	–
2.7.2.	Brucellose ovine et caprine (<i>Brucella ovis</i> exclue)	BBAT, FC	Test à la brucelline, EPF
2.7.3/4.	Arthrite/encéphalite caprine et Maedi-visna	IDG, ELISA	–
2.7.5.	Agalaxie contagieuse	–	–
2.7.6.	Pleuropneumonie contagieuse caprine	FC	–
2.7.7.	Avortement enzootique des brebis (Chlamydiose ovine)	–	FC
2.7.8.	Maladie du mouton de Nairobi	–	–
2.7.9.	Épididymite contagieuse ovine (<i>Brucella ovis</i>)	FC	ELISA
2.7.10.	Adénomatose pulmonaire ovine (adénocarcinome)	–	–
2.7.11.	Peste des petits ruminants	SN	ELISA
2.7.12.	Salmonellose (<i>S. abortusovis</i>)	–	–
2.7.13.	Tremblante	–	–
2.7.14.	Clavelée et variole caprine	–	SN
2.8.1.	Peste porcine africaine	ELISA	IFI
2.8.2.	Rhinite atrophique du porc	–	–
2.8.3.	Peste porcine classique (hog cholera)	ELISA, FAVN, NPLA	–
2.8.4.	Encéphalite due au virus Nipah	–	–
2.8.5.	Brucellose Porcine (<i>Brucella suis</i>)	ELISA	BBAT, EPF
2.8.6.	Cysticercose porcine	–	–
2.8.7.	Syndrome dysgénésique et respiratoire du porc	–	ELISA, IFI, IPMA

Chapitre No.	Nom de la maladie	Épreuves prescrites	Épreuves de substitution
2.8.8.	Grippe porcine	–	–
2.8.9.	Maladie vésiculeuse du porc	SN	ELISA
2.8.10.	Encéphalomyélite à Teschovirus (anciennement encéphalomyélite à entérovirus ou maladie de Teschen/Talfan)	–	SN
2.8.11.	Gastro-entérite transmissible	–	SN, ELISA
2.9.1.	Maladies animales à Bunyavirus (Fièvre de la Vallée du Rift non comprise)	–	–
2.9.2.	Variole des camélidés	–	–
2.9.3.	<i>Campylobacter jejuni</i> et <i>Campylobacter coli</i>	–	–
2.9.4.	Cryptosporidioses	–	–
2.9.5.	Cysticercoses	–	Id. agent
2.9.6.	Maladies dues aux virus Hendra et Nipah	–	–
2.9.7.	<i>Listeria monocytogenes</i>	–	–
2.9.8.	Gales	–	Id. agent
2.9.9.	Salmonelloses	–	Id. agent
2.9.10.	Toxoplasmose	–	–
2.9.11.	<i>Escherichia coli</i> vérocytotoxinogène	–	–
2.9.12.	Zoonoses transmissibles depuis les primates autres que l'homme	–	–

N.B. : les épreuves prescrites par le *Code terrestre* aux fins des échanges internationaux figurent en bleu dans le présent *Manuel terrestre*.

Abréviations

Agg.	Épreuve d'Agglutination	IHA	Inhibition de l'Héماغglutination
BBAT	Épreuves à l'antigène tamponné pour Brucella (Buffered <i>Brucella</i> antigen test)	IDG	Immunodiffusion en gélose
CAT	Test d'agglutination sur carte (Card agglutination test)	IPMA	Épreuve d'immunoperoxydase sur monocouche de culture cellulaire (Immunoperoxidase monolayer assay)
DTH	Hypersensibilité retardée (Delayed-type hypersensitivity)	MAT	Épreuve d'agglutination microscopique (Microscopic agglutination test)
ELISA	Méthode immuno-enzymatique (Enzyme-linked immunosorbent assay)	NPLA	Titration par neutralisation liée à la peroxydase (Neutralising peroxidase-linked assay)
EPF	Épreuve de polarisation en fluorescence	PCR	Réaction d'amplification en chaîne par polymérase (Polymerase chain reaction)
FAVN	Neutralisation virale par anticorps fluorescents (Fluorescent antibody virus neutralisation)	PRN	Neutralisation par réduction des plaques (Plaque reduction neutralisation)
FC	Fixation du complément	SN	Séroneutralisation
Id. agent	Identification de l'agent pathogène	–	Absence de test de référence
IFI	Immunofluorescence indirecte		

ABRÉVIATIONS USUELLES UTILISÉES DANS CE MANUEL TERRESTRE

ABTS	2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulphonic acid	DLE ₅₀	Dose létale pour 50 % des embryons
AcM	Anticorps monoclonal (Mabs en anglais)	DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
AcP	Anticorps polyclonal (Pabs en anglais)	DMSO	Dimethyl sulphide
AFLP	Polymorphisme de la longueur des fragments amplifiés (Amplified Fragment Length Polymorphism)	DO	Densité optique
ARL	Agglutination rapide sur lame	DP ₅₀	Dose protectrice 50 %
ATCC ¹	American type culture collection	DTH	Hypersensibilité retardée (Delayed-type hypersensitivity)
BBAT	Épreuve à l'antigène tamponné pour <i>Brucella</i> (Buffered <i>Brucella</i> antigen test)	EAT	Épreuve à l'antigène tamponné
BGPS	Extrait de bœuf-glucose-peptone-sérum (milieu)	ECP	Effet cytopathogène
BHK	Lignée cellulaire de rein de jeunes hamster (Baby hamster kidney)	EDTA	Ethylene diamine tetra-acetic acid
BPAT	Épreuve d'agglutination sur plaque à l'antigène tamponné (Buffered plate antigen test)	ELISA	Épreuve immunoenzymatique (Enzyme-linked immunosorbent assay)
BSA	Albumine de sérum bovin (Bovine serum albumin)	EAPS	Exempts d'agents pathogènes spécifiques (SPF en anglais)
BSF	Facteurs de sérum bovin (Bovine serum factors)	FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
CATT	Test d'agglutination sur carte (Card agglutination test)	FAVN	Neutralisation virale par anticorps fluorescents (Fluorescent antibody virus neutralisation)
CEF	Fibroblastes d'embryon de poulet (Chicken embryo fibroblasts)	FC	Fixation du complément (épreuve)
CHU ₅₀	Unité de complément hémolytique 50 % (Complement haemolytic units)	FLK	Cellules de rein de fœtus d'agneau (Foetal lamb kidney)
CIEP	Contre-immunoélectrophorèse (Counter immunoelectrophoresis)	FPA	Test de polarisation de fluorescence (Fluorescent polarisation assay)
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité	g	Force relative de centrifugation
CPLM	Cysteine-peptone-foie infusion maltose (milieu)	GR	Globule rouge
CSY	Caséine-sucrose-levure (gélose)	GRM	Globule rouge de mouton
DEAE	Diethylaminoethyl	HA	Hémagglutination (épreuve)
DEPC	Diethylpyrocarbonate	HAI	Hémagglutination indirecte (épreuve)
DFF ₅₀	Dose formant 50 % de foyer	HAD	Hémadsorption
DI ₅₀	Dose moyenne infectante	HBSS	Solution équilibrée de Hank (Hanks' balanced salt solution)
DICT ₅₀	Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire	HEP	High-egg-passage (virus)
DIE ₅₀	Dose de virus infectant 50 % des embryons	HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine, N-2-ethanesulphonic acid (tampon)
DIO ₅₀	Dose de virus infectant 50 % des œufs	HRPO	Peroxydase de raifort (Horseradish peroxidase)
DIP ₅₀	Dose de virus infectant 50 % des poulets	IATA	Association Internationale du Transport Aérien
DL ₅₀	Dose létale 50 %	IC	Inhibition de la croissance (épreuve)
		IDG	Immunodiffusion en gélose (épreuve) (AGID en anglais)
		IF	Immunofluorescence (épreuve)

IFI	Immunofluorescence indirecte (épreuve) (IFA en anglais)	PFGE	Électrophorèse en champs pulsés (Pulse-field gel electrophoresis)
IHA	Inhibition de l'hémagglutination	PFU	Unités formatrices de plaques (Plaque-forming unit)
IHC	Immunohistochimie	PPD	Dérivés protéiques purifiés (Purified protein derivative)
IMS	Séparation immunomagnétique (Immunomagnetic Separation)	PPLO	Pleuropneumonia-like organisms
IP	Infecté persistant	PRN	Neutralisation par réduction des plages (Plaque reduction neutralisation)
IPIC	Indice de pathogénicité intracérébrale (ICPI en anglais)	PSG	Phosphate buffered saline glucose (tampon)
IPMA	Épreuve d'immunoperoxydase sur monocouche de culture cellulaire (Immunoperoxidase monolayer assay)	RB	Rose bengale
IPIV	Index de pathogénicité par voie intraveineuse (IVPI en anglais)	RFLP	Polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (Restriction fragment length polymorphism)
ISO	Organisation internationale de normalisation (International Organization for Standardization)	RK	Rein de lapin (Rabbit kidney)
ITCF	Isothiocyanate de fluorescéine (FITC en anglais)	RT-PCR	Technique de la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (Reverse-transcription polymerase chain reaction)
LEP	Passage faible en œufs (Low egg passage) (virus)	SAF	Fibrilles associées à la tremblante (Scrapie-associated fibrils)
LPS	Lipopolysaccharide	SAT	Épreuve de séroagglutination (Serum agglutination test)
MAT	Épreuve d'agglutination microscopique (Microscopic agglutination test)	SFB	Sérum fœtal bovin
MCA	Membrane chorioallantoïdienne	SDS	Sodium dodecyl sulphate
MCS	Stock de lot de semence primaire des cellules (Master cell stock)	SN	Épreuve de Séroneutralisation virale (VN en anglais)
MDBK	Rein de bovin Madin-Darby (Madin-Darby Bovine Kidney)	SNC	Système nerveux central
MEM	Milieu essentiel minimum	SPG	Sucrose phosphate glutamate
MSV	Semence primaire du virus (Master Seed Virus)	SVF	Sérum de veau fœtal
mZn	Ziehl-Neelsen modifiée (méthode)	TMB	Tetramethyl benzidine
OMS	Organisation mondiale de la santé	TP ₅₀	Temps de persistance ou de guérison 50%
OPD	Orthophenyldiamine (tampon)	TSI	Gélose au citrate de fer (III) et aux 3 sucres (Triple sugar iron)
ORF	Cadre de lecture ouvert (Open reading frame)	UFC	Unités formant colonie
PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide (Polyacrylamide gel electrophoresis)	UFF	Unités formant foyer
PAP	Peroxydase-antiperoxydase (pour le protocole de coloration)	UFP	Unités formant plages
PAS	Réaction de Schiff à l'acide périodique (Periodic acid-Schiff)	UI	Unités Internationales
pb	paire de base	UIFC	Unités internationales de fixation du complément
PBS	Phosphate buffered saline (tampon)	Vero	Cellules de rein de singe vert africain (African green monkey kidney)
PCR	Réaction d'amplification en chaîne par polymérase (Polymerase chain reaction)	VVM	Virus vivant modifié

1 American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, États-Unis d'Amérique

GLOSSAIRE TERMINOLOGIQUE

Le choix des définitions présentées ci-dessous a été arrêté en se limitant à celles qui sont susceptibles d'être utiles aux utilisateurs du présent Manuel terrestre de l'OIE.

- **Absorbance/densité optique**

L'absorbance et la densité optique sont des termes utilisés pour indiquer l'intensité de réaction. Un spectrophotomètre est employé pour mesurer la quantité de lumière absorbée par un échantillon pour une longueur d'onde spécifique, et l'absorbance est proportionnelle à la quantité de la substance à analyser présente.

- **Activité**

Efficacité relative d'un produit biologique déterminée par des méthodes d'analyse appropriées (initialement, l'activité est mesurée à l'aide d'un test réalisé chez les animaux. Ultérieurement, il est possible de le corrélérer à des tests de teneur en antigènes ou de recherche d'une réponse humorale en vue de réaliser des contrôles systématiques d'activité des lots).

- **Animal de référence**

Tout animal dont le statut infectieux peut être défini en termes non équivoques ; peut inclure des animaux malades, infectés, vaccinés, immunisés ou n'ayant jamais été en contact avec l'agent.

- **Caractéristiques de performance**

Attribut d'une méthode d'analyse. Il peut s'agir de la sensibilité et de la spécificité analytiques, de l'exactitude et de la précision, de la sensibilité et de la spécificité diagnostiques et/ou de la répétabilité et de la reproductibilité.

- **Cellules primaires (lignée, stock, semence)**

Fractions aliquotes de cellules à un niveau de passage défini, destinées à être utilisées pour la préparation ou l'analyse d'un produit biologique, distribuées dans des conteneurs en une opération unique, traitées ensemble et stockées de manière à garantir l'uniformité et la stabilité et à empêcher toute contamination.

- **Cellules de première explantation**

Un ensemble de cellules initiales issues d'un tissu normal en allant jusqu'à la dixième sous-culture comprise.

- **Centrifugation**

Dans tout le texte, la vitesse de centrifugation a été exprimée en Force centrifuge relative, représentée par '**g**'. La formule est la suivante :

$$\frac{(\text{RPM} \times 0,10472)^2}{980} \times \text{rayon (cm)} = \mathbf{g}$$

où RPM représente la vitesse du rotor exprimée en nombre de tours par minute (RPM pour Rotation Par Minute), et où le rayon (cm) est le rayon du rotor jusqu'au fond du tube, en centimètres.

Il peut être nécessaire de calculer les RPM nécessaires pour atteindre une valeur donnée de **g**, avec un rotor particulier. La formule est la suivante :

$$\text{RPM} = \frac{\sqrt{\mathbf{g} \times 980} / \text{rayon (cm)}}{0,10472}$$

- **Comparaison interlaboratoires (test de l'anneau)**

Toute évaluation des performances d'une épreuve et/ou de la compétence des laboratoires pour la réalisation, par deux laboratoires ou plus, de tests sur des échantillons définis ; un laboratoire peut servir de référence pour définir les caractéristiques de l'échantillon testé.

- **Contrôle des compétences**

Évaluation de la compétence d'un laboratoire réalisée au moyen d'une comparaison interlaboratoires ; suppose que les laboratoires participants utilisent des méthodes d'analyse, des réactifs et des témoins identiques ou similaires, et que les résultats sont exprimés qualitativement.

- **Contrôle en cours de fabrication**

Procédures effectuées pendant la fabrication d'un produit biologique pour garantir que le produit satisfera les normes de qualité adoptées.

- **Dilutions**

Lorsque des dilutions sont indiquées pour constituer des réactifs liquides, elles sont exprimées par exemple en 1 pour 4 ou 1/4, ce qui signifie une partie ajoutée à trois parties, soit une solution à 25 % de A dans B.

- v/v – volume/volume (deux liquides).
- w/v – poids/volume (solide ajouté à un liquide).

- **Dilutions utilisées dans les épreuves de séroneutralisation virale**

Deux conventions différentes permettent d'exprimer la dilution utilisée dans les épreuves de séroneutralisation virale. En Europe, il est d'usage d'exprimer la dilution avant l'ajout de l'antigène, alors qu'aux États-Unis d'Amérique et ailleurs, il est habituel d'exprimer les dilutions après l'ajout de l'antigène.

Dans le *Manuel terrestre*, ces deux conventions différentes sont désignées respectivement par « dilution initiale » ou « dilution finale ».

- **Échantillon**

Matériel tiré d'un prélèvement et utilisé pour les besoins d'une analyse.

- **Efficacité**

Faculté spécifique d'un produit biologique de produire le résultat pour lequel il est proposé s'il est utilisé dans les conditions recommandées par le fabricant.

- **Épreuve**

Synonyme de test ou de méthode d'analyse, par exemple épreuve immuno-enzymatique, épreuve de fixation du complément, ou la réaction d'amplification en chaîne par polymérase.

- **Épreuves**

- **Prescrites**

Méthodes d'analyse qui sont exigées par le *Code sanitaire pour les animaux terrestres* de l'OIE pour les mouvements internationaux d'animaux et de produits d'origine animale et qui sont considérées comme les plus adaptées pour la détermination du statut sanitaire des animaux.

- **De substitution**

Méthodes d'analyse considérées dans le présent *Manuel terrestre* comme adaptées au diagnostic d'une maladie dans des circonstances locales, bien qu'elles soient susceptibles d'être utilisées lors de l'importation ou de l'exportation à l'issue d'une convention bilatérale.

- **De dépistage**

Tests de sensibilité diagnostique élevée adaptés à une application à grande échelle.

- **De confirmation**

Méthodes d'analyse de spécificité diagnostique élevée qui sont utilisées pour confirmer des résultats, généralement des résultats positifs, issus d'autres méthodes d'analyse.

- **Exactitude**

Degré de concordance entre un résultat d'analyse et la valeur attendue pour une substance de référence d'activité ou de titre connus.

- **Exempt d'agents pathogènes spécifiques (SPF en anglais)**

Animal dont il a été démontré au moyen de tests appropriés qu'il est indemne de micro-organismes pathogènes précisés et s'applique également aux œufs provenant d'oiseaux exempts de l'agent pathogène spécifique.

- **Harmonisation**

Résultat d'un accord entre laboratoires visant à étalonner des méthodes d'analyse similaires, à ajuster des seuils diagnostiques et à exprimer des données d'épreuves de manière à permettre une interprétation uniforme des résultats obtenus par les différents laboratoires..

- **Incidence**

Estimation de la proportion de nouveaux cas d'infection au sein d'une population exposée sur une période donnée ; à ne pas confondre avec la prévalence.

- **Innocuité**

Absence de propriétés entraînant des réactions locales ou systémiques néfastes en cas d'utilisation conforme aux recommandations ou suggestions du fabricant et absence de danger connu pour les animaux, les personnes et l'environnement en contact.

- **Laboratoire de référence**

Laboratoire dont l'expertise scientifique et diagnostique est reconnue pour une maladie animale précise et/ou pour sa méthodologie d'analyse. Cette expertise comprend la capacité de caractériser et d'assigner des valeurs à des matériels de référence.

- **Lignée cellulaire**

Une lignée transformée de façon stable de cellules qui sont dotées d'une capacité élevée de multiplication *in vitro*.

- **Limite/seuil**

Valeur de résultat d'une analyse établie pour permettre de distinguer les résultats négatifs des résultats positifs lors d'une épreuve ; il peut exister une zone indéterminée ou zone de suspicion.

- **Lot**

Tout vaccin ou autre réactif, tel qu'un antigène ou des antisérums, issu de la même portion homogène et identifié par un numéro de code unique.

- **Méthode d'analyse**

Procédure technique spécifiée, destinée à la détection d'un analyte. Voir « Épreuve ».

- **Précision**

Degré de dispersion des résultats correspondant à l'analyse répétée d'un échantillon, exprimé par des méthodes statistiques telles que l'écart-type ou les limites de confiance.

- **Prélèvement**

Matériel soumis aux tests.

- **Prévalence**

Estimation de la proportion d'animaux infectés dans une population à un moment précis ; à ne pas confondre avec l'incidence.

- **Produit final (lot)**

Tous les conteneurs finaux scellés qui ont été remplis à partir du même lot homogène de vaccin dans le cadre d'une session de travail, lyophilisés ensemble dans le cadre d'une opération continue (le cas échéant), scellés dans le cadre d'une session de travail et identifiés par un numéro de code unique.

- **Pureté**

Qualité d'un produit biologique préparé sous sa forme finale et :

- a) Relativement exempt de tout micro-organisme étranger et de matériel étranger (organique ou inorganique), absence déterminée par les méthodes d'analyse adaptées au produit ; et
- b) Exempt de micro-organismes étrangers ou de matériels qui pourraient avoir des effets nuisibles sur la sécurité, l'activité et l'efficacité du produit.

- **Réactifs de référence**

- **Réactifs de référence internationaux**

Réactifs de référence à partir desquels sont étalonnés tous les autres réactifs et épreuves. Préparés et distribués par un Laboratoire de référence international.

- **Réactifs de référence nationaux**

Réactifs de référence étalonnés par comparaison avec les réactifs de référence internationaux. Préparés et distribués par un Laboratoire de référence national.

- **Étalons de travail (réactifs)**

Réactifs de référence étalonnés par comparaison avec les réactifs de référence nationaux ou, en l'absence de réactifs de référence nationaux, étalonné par rapport à un réactif de référence interne bien caractérisé. Utilisé comme témoin ou pour la normalisation des résultats dans les épreuves diagnostiques de routine.

- **Réaction croisée**

Voir « Réaction faussement positive ».

- **Réaction faussement négative**

Réactivité négative observée lors de l'analyse d'un échantillon provenant d'un animal exposé au micro-organisme concerné ou infecté par celui-ci ; peut être due à un manque de sensibilité analytique, à une spécificité analytique limitée ou à une dégradation de l'analyte ; diminue la sensibilité diagnostique.

- **Réaction faussement positive**

Réactivité positive observée lors de l'analyse d'un échantillon mais qui n'est pas attribuable à l'exposition au micro-organisme concerné ni à une infection par celui-ci ; peut être due à une réactivité croisée immunologique, à une contamination croisée de l'échantillon ou à des réactions non spécifiques ; diminue la spécificité diagnostique.

- **Répétabilité**

Degré de concordance entre des analyses répétées d'un échantillon, à l'intérieur d'une même séquence analytique ou d'une séquence à l'autre, avec une méthode d'analyse identique et dans un laboratoire donné.

- **Reproductibilité**

Capacité d'une épreuve à fournir des résultats cohérents lorsqu'elle est pratiquée sur des fractions d'un même échantillon et en suivant le même protocole dans des laboratoires différents.

- **Semence de production**

Un micro-organisme à un niveau de passage précisé qui est utilisé sans propagation ultérieure pour commencer la préparation d'un volume de production.

- **Semence de travail**

Organismes à un niveau de passage situé entre la semence primaire et la semence de production.

- **Semence (agent, souche) primaire**

Fractions aliquotes d'un micro-organisme à un niveau de passage spécifique, à partir desquelles sont réalisés tous les autres passages, et qui sont obtenues à partir d'un lot unique, distribuées dans des conteneurs en une seule opération, traitées ensemble et stockées de manière à garantir l'uniformité et la stabilité et à empêcher toute contamination.

- **Sensibilité (analytique)**

Synonyme de « limite de détection ». Plus petite quantité détectable d'analyte qu'il est possible de mesurer avec une certitude définie. Il peut s'agir d'anticorps, d'antigènes, d'acides nucléiques ou d'organismes vivants.

- **Sensibilité (diagnostique)**

Proportion d'animaux de référence connue comme infectée présentant un résultat positif à l'analyse. Les animaux infectés pour lesquels le résultat est négatif sont considérés comme des « faux négatifs ».

- **Sensibilité (relative)**

Proportion d'échantillons de référence, définis comme positifs par une méthode d'analyse ou une combinaison de méthodes d'analyse et dont le résultat est également positif avec l'épreuve à l'étude.

- **Spécificité (analytique)**

Faculté du test à distinguer entre les analytes cibles et les autres substances de la simple matrice ; plus la spécificité analytique est élevée, moindre est la proportion de faux positifs.

- **Spécificité (diagnostique)**

Proportion d'animaux de référence connue comme non infecté présentant un résultat négatif lors d'une épreuve. Les animaux de référence non infectés chez lesquels le résultat est positif sont considérés comme des « faux positifs ».

- **Spécificité (relative)**

Proportion d'échantillons de référence, définis comme négatifs par une ou une combinaison de méthodes d'analyse, et dont le résultat est également négatif avec l'épreuve à l'étude.

- **Stérilité**

Absence de micro-organismes contaminants viables, démontrée par des tests approuvés et appropriés.

- **Température ambiante**

L'expression « température ambiante » désigne la température d'un environnement de travail confortable. Il n'est pas possible d'en fixer les limites précises, mais les valeurs indicatives sont comprises entre 18 et 25°C. Quand un test précise la valeur de la température ambiante, elle doit être respectée, au besoin par climatisation, faute de quoi les paramètres du test risquent d'être modifiés.

- **Tests d'équivalence**

Détermination de certaines caractéristiques de performance de dosage de méthodes d'analyse nouvelles et/ou différentes au moyen d'une comparaison entre laboratoires par rapport à une méthode d'analyse de référence ; implique dans cette définition que les laboratoires participants utilisent leurs propres méthodes d'analyse, réactifs et témoins et que les résultats soient exprimés qualitativement.

- **Valeur prédictive (négative)**

Probabilité qu'un animal ne soit pas exposé ou soit indemne d'infection étant donné qu'il est testé négatif ; la valeur prédictive dépend de la sensibilité et de la spécificité diagnostiques des épreuves de diagnostic ainsi que de la prévalence de l'infection.

- **Valeur prédictive (positive)**

Probabilité qu'un animal ait été exposé ou infecté étant donné qu'il est testé positif ; la valeur prédictive dépend de la sensibilité et de la spécificité diagnostiques des épreuves de diagnostic ainsi que de la prévalence de l'infection.

- **Vérifications internes**

Toutes les activités liées à l'assurance qualité exécutées au sein d'un laboratoire directement liées à la surveillance, à la validation et au maintien des performances et des aptitudes techniques des épreuves.

*
* *

CONTRIBUTEURS

CONTRIBUTEURS AVEC LEUR ADRESSE PROFESSIONNELLE AU MOMENT DE LA RÉDACTION

Les chapitres du Manuel terrestre sont préparés par des contributeurs invités. Conformément à la procédure officielle de l'OIE, tous les chapitres sont diffusés aux Délégués des Membres de l'OIE et à d'autres experts de la maladie en vue de leurs commentaires. Puis, la Commission des normes biologiques et l'éditeur consultant modifient le texte pour prendre en compte les commentaires reçus. Une fois cette révision terminée et le texte finalisé, le Manuel terrestre est présenté à l'Assemblée mondiale des Délégués de l'OIE durant sa Session générale annuelle pour adoption avant d'être imprimé. Le Manuel terrestre est donc réputé constituer un Texte normatif de l'OIE qui a été généré par un accord international. C'est la raison pour laquelle les noms des contributeurs ne figurent pas dans les différents chapitres mais sont énumérés ci-dessous. La Commission des normes biologiques a grandement apprécié le travail des contributeurs suivants :

- | | |
|---|--|
| 1.1.1. <i>Prélèvement et expédition des échantillons pour le diagnostic</i> | Dr J.E. Pearson
4016 Phoenix St., Ames, Iowa 50014,
États-Unis d'Amérique. |
| 1.1.2. <i>Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries</i> | Dr B. Schmitt
National Veterinary Services Laboratories,
Diagnostic Virology Laboratory, P.O. Box 844,
Ames, IA 50010, États-Unis d'Amérique.

Dr P. Le Blanc Smith
Biocontainment Microbiologist, CSIRO Livestock
Industries, Australian Animal Health Laboratory
(AAHL), Private Bag 24, Geelong, Victoria 3220,
Australie. |
| 1.1.3. <i>Gestion de la qualité dans les laboratoires de diagnostic vétérinaire</i> | Dr A. Wiegers
USDA, APHIS, Veterinary Services, Center for
Veterinary Biologics, 510 South 17th. Street, Suite
104, Ames, Iowa 50010, États-Unis d'Amérique. |
| 1.1.4. <i>Principes de la validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses</i> | Dr R.H. Jacobson
27801 Skyridge Drive, Eugene, Oregon 97405,
États-Unis d'Amérique.

Dr P. Wright
Aquatic Animal Health, Fisheries and Oceans
Canada, 343 University Avenue, Moncton,
New Brunswick, E1C 9B6, Canada. |
| 1.1.5. <i>Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses</i> | Dr S. Belak & Dr P. Thorén
Department of Virology, National Veterinary
Institute, Ulls väg 2B, SE-751 89 Uppsala, Suède. |

1.1.6. *Méthodes de laboratoire utilisées pour les essais d'antibiorésistance*

Dr D. White

Division of Animal and Food Microbiology, National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS), US Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, Office of Research, 8401 Muirkirk Road, Laurel, MD 20708, États-Unis d'Amérique.

1.1.7. *Les biotechnologies dans le diagnostic des maladies infectieuses et le développement des vaccins*

Dr D. Knowles & Dr H. Li

Animal Disease Research Unit, ARS, USDA, Washington State University, Pullman, Washington 99164-6630, États-Unis d'Amérique.

Prof. P.-P. Pastoret

World Organisation for Animal Health (OIE), 12 rue de Prony, 75017 Paris, France.

1.1.8. *Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire*

Dr B. Rippke

Center for Veterinary Biologics, USDA, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, Suite 104, 510 South 17th Street, Ames, IA 50010, États-Unis d'Amérique.

Dr D.J.K. Mackay

European Medicines Agency, Veterinary Medicines and Inspections, 7 Westferry Circus, Canary Wharf, London E14 4HB, Royaume-Uni.

Dr M. Lombard

International Association for Biologicals (IABs), 22 Rue Crillon, 69006 Lyon, France.

1.1.9. *Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques*

Dr L. Elsen

USDA, APHIS, Center for Veterinary Biologics, Suite 104, 510 South 17th Street, Ames, Iowa 50010, États-Unis d'Amérique.

1.1.10. *Lignes directrices pour les normes internationales applicables aux banques de vaccins*

Groupe ad hoc de l'OIE sur les banques d'antigènes et de vaccins de la fièvre aphteuse

1.1.11. *Rôle des autorités officielles dans la réglementation internationale des produits biologiques à usage vétérinaire*

Dr Ph. Vannier

AFSSA Ploufragan, Laboratoire d'études et de recherches avicoles et porcines, Zoopôle des Côtes d'Armor-Les Croix, BP 53, 22440 Ploufragan, France.

Dr R. Hill

Center for Veterinary Biologics, USDA, APHIS, Veterinary Services, P.O. Box 844, Ames Iowa 50010, États-Unis d'Amérique.

Dr O. Itoh

National Veterinary Assay Laboratory, JMAFF, 1-15-1 Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japon.

Dr P. Dehaumont

AFSSA Fougères, Agence nationale du médicament vétérinaire, B.P. 203, 35302 Fougères Cedex, France.

2.1.1. *Fièvre charbonneuse*

Dr P.R. Coker

Pathogen Research & Consulting, LLC,
Shreveport, Louisiana 71104,
États-Unis d'Amérique.

2.1.2. *Maladie d'Aujeszky*

Prof. B. Toma (à la retraite) & Prof. N. Haddad

École nationale vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du
Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex,
France.

Dr Ph. Vannier

AFSSA Ploufragan, Laboratoire d'études et de
recherches avicoles et porcines, Zoopôle des
Côtes d'Armor-Les Croix, BP 53, 22440
Ploufragan, France.

2.1.3. *Fièvre catarrhale du mouton*

Dr P. Daniels

Australian Animal Health Laboratory, CSIRO
Livestock Industries, 5 Portarlington Road,
Geelong, Victoria 3220, Australie.

2.1.4. *Echinococcose/hydatidose*

Dr M. Kamiya

Laboratory of Environmental Zoology, Department
of Biosphere and Environmental Sciences, Faculty
of Environmental Systems, Rakuno Gakuen
University, Midori-machi 582, Ebetsu 069-8501,
Hokkaido, Japon.

2.1.5. *Fièvre aphteuse*

Dr R.P. Kitching

National Centre for Foreign Animal Disease,
1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba
R3E 3M4, Canada.

Dr P.V. Barnett & Dr D. Paton

Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory,
Ash Road, Pirbright, Surrey GU24 0NF,
Royaume-Uni.

Dr D. Mackay

European Medicines Agency, Veterinary
Medicines and Inspections, 7 Westferry Circus,
Canary Wharf, London E14 4HB, Royaume-Uni.

2.1.6. *Cowdriose*

Dr D. Martinez

CIRAD-EMVT, Campus International de
Baillarguet - TA30/G, 34398 Montpellier Cedex 5,
France.

Dr N. Vachiéry

CIRAD-EMVT, Domaine de Duclos, Prise d'Eau,
97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, France.

Prof. F. Jongejan

Department of Parasitology & Tropical Veterinary
Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht
University, P.O. Box 80.165, 3508 TD Utrecht,
Pays-Bas.

ET

Department of Veterinary Tropical Diseases,
Faculty of Veterinary Science, University of
Pretoria, Onderstepoort 0110, Afrique du Sud.

- 2.1.7. *Encéphalite japonaise*
Dr T. Kondo
Epizootic Research Center, Equine Research Institute, Japan Racing Association, 1400-4 Shiba, Shimotsuke, Tochigi 329-0412, Japon.
- 2.1.8. *Leishmaniose*
Dr L. Gradoni & Dr M. Gramiccia
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, I-00161 Rome, Italie.
- 2.1.9. *Leptospirose*
Prof. C.A. Bolin
Diagnostic Center for Population & Animal Health, College of Veterinary Medicine, Michigan State University, 4125 Beaumont Rd, Lansing, Michigan 48910, États-Unis d'Amérique.
- 2.1.10. *Myiase à Cochliomyia hominivorax et Myiase à Chrysomya bezziana*
Dr M.J.R. Hall
Department of Entomology, The Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7 5BD, Royaume-Uni.
- 2.1.11. *Paratuberculose (maladie de Johne)*
Dr J. Gwozdz
Department of Primary Industries, Victoria, 475 Mickleham Road, Attwood, VIC 3049, Australie.
- 2.1.12. *Fièvre Q*
Dr E. Rousset, Dr V. Duquesne, Dr P. Russo & M.F. Aubert
AFSSA Sophia Antipolis, Laboratoire d'Études et de Recherches sur les Petits Ruminants et les Abeilles (LERPRA), Les Templiers, 105 route des Chappes, BP 111, 06902 Sophia Antipolis Cedex, France.
- 2.1.13. *Rage*
Dr F. Cliquet & Dr J. Barrat
AFSSA Site de Nancy, Technopôle Agricole et Vétérinaire, B.P. 40009, 54220 Malzeville, France.
- 2.1.14. *Fièvre de la Vallée du Rift*
Dr G.H. Gerdes
Onderstepoort Veterinary Institute, Private Bag X05, Onderstepoort 0110, Afrique du Sud.
- 2.1.15. *Peste bovine*
Dr W.P. Taylor
16 Mill Road, Angmering, Littlehampton, West Sussex BN16 4HT, Royaume-Uni.
- Dr P. Roeder**
Hollyhedge Cottage, Spats Lane, Headley Down, Bordon, Hampshire GU35 8SY, Royaume-Uni.
- 2.1.16. *Trichinellose*
Dr A. Gajadhar & Dr L. Forbes
Canadian Food Inspection Agency, Centre for Foodborne & Animal Parasitology, 116 Veterinary Road, Saskatoon, Saskatchewan S7N 2R3 Canada.
- 2.1.17. *Infections à Trypanosoma evansi (y compris le Surra)*
Dr A.G. Luckins
Centre for Tropical Veterinary Medicine, Easter Bush Veterinary Centre, Roslin, Midlothian, Écosse EH25 9RG, Royaume-Uni.
- 2.1.18. *Tularémie*
Dr T. Mörner
Department of Pathology and Wildlife Diseases, Swedish National Veterinary Institute, Suède.

- 2.1.19. *Stomatite vésiculeuse*
- Dr S.L. Swenson**
USDA, APHIS, National Veterinary Services
Laboratories, P.O. Box 844, Ames, Iowa 50010,
États-Unis d'Amérique.
- 2.1.20. *Fièvre de West Nile*
- Dr E.N. Ostlund**
USDA, APHIS, National Veterinary Services
Laboratories, P.O. Box 844, Ames, Iowa 50010,
États-Unis d'Amérique.
- 2.2.1. *Acarapiose des abeilles mellifères*
- Dr W. Ritter**
CVUA-Freiberg, FB: Bienen (bee team), Am
Moosweiher 2, D79018 Freiberg, Allemagne.
- 2.2.2. *Loque américaine des abeilles mellifères*
- 2.2.3. *Loque européenne des abeilles mellifères*
- Dr D.C. de Graaf**
Laboratory of Zoophysiology, University of Ghent,
K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Ghent, Belgique.
- 2.2.4. *Nosérose des abeilles mellifères*
- Dr W. Ritter**
CVUA-Freiberg, Animal Health, Am Moosweiher
2, D79018 Freiberg, Allemagne.
- 2.2.5. *Infestation par le petit coléoptère des ruches*
(*Aethina tumida*)
- Dr W. Ritter**
CVUA-Freiberg, Animal Health, Am Moosweiher
2, D79018 Freiberg, Allemagne.
- Dr P. Neumann**
Swiss Bee Research Centre, Agroscope
Liebefeld-Posieux, Research Station ALP,
Schwarzenburgstrasse 161, CH-3003 Bern,
Suisse.
- Dr J.D. Ellis**
Department of Entomology, The University of
Georgia, Athens, GA 30602,
États-Unis d'Amérique.
- 2.2.6. *Infestation des abeilles mellifères par*
Tropilaelaps (Tropilaelaps spp.)
- 2.2.7. *Varroose des abeilles mellifères*
- Dr W. Ritter**
CVUA-Freiberg, FB: Bienen (bee team), Am
Moosweiher 2, D79018 Freiberg, Allemagne.
- 2.3.1. *Chlamydie aviaire*
- Dr A.A. Andersen (à la retraite)**
Formerly USDA, ARS, National Animal Disease
Center, P.O. Box 70, Ames, Iowa 50010,
États-Unis d'Amérique.
- 2.3.2. *Bronchite infectieuse aviaire*
- Dr J. Gelb**
Dept of Animal and Food Sciences and the Avian
Biosciences Center, University of Delaware,
531 South College Avenue, Newark, Delaware
19716-2150, États-Unis d'Amérique.
- 2.3.3. *Laryngotrachéite infectieuse aviaire*
- Dr R.C. Jones**
Department of Veterinary Pathology, University of
Liverpool, Jordan Building, Veterinary Field
Station, 'Leahurst', Neston, South Wirral
CH64 7TE, Royaume-Uni.
- 2.3.4. *Influenza aviaire*
- Dr D.J. Alexander**
VLA Weybridge, New Haw, Addlestone,
Surrey KT15 3NB, Royaume-Uni.

2.3.5. *Mycoplasmosse aviaire*
(*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*)

Dr S.H. Kleven

University of Georgia, Poultry Diagnostic and Research Center, 953 College Station Road, Athens, Georgia 30602-4875, États-Unis d'Amérique.

Dr J.M. Bradbury

University of Liverpool, Department of Veterinary Pathology, Veterinary Teaching Hospital, Leahurst, Neston H64 7TE, Royaume-Uni.

2.3.6. *Tuberculose aviaire*

Dr D.V. Cousins

Australian Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Western Australia Dept of Agriculture and Food, Locked Bag N° 4, Bentley Delivery Centre, Bentley WA 6983, Australie.

2.3.7. *Peste du canard*

2.3.8. *Hépatite virale du canard*

Dr P.R. Woolcock

California Animal Health and Food Safety, University of California, Davis, 2789 South Orange Avenue, Fresno, California 93725, États-Unis d'Amérique.

2.3.9. *Choléra aviaire*

Dr R. Kunkle,

National Animal Disease Center, P.O. Box 70, Ames, Iowa 50010, États-Unis d'Amérique.

Dr M.A. Wilson

National Animal Disease Center, 1800 N. Dayton Avenue, Ames, Iowa 50010, États-Unis d'Amérique.

2.3.10. *Variole aviaire*

Dr D.N. Tripathy

University of Illinois at Urbana-Champaign, College of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pathobiology, 2001 South Lincoln Avenue, Urbana, Illinois 61802, États-Unis d'Amérique.

2.3.11. *Typhose et Pullorose*

Dr R. Davies

VLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, Royaume-Uni.

2.3.12. *Bursite infectieuse (Maladie de Gumboro)*

Dr N. Etteradossi

AFSSA-site de Ploufragan/Brest, Laboratoire d'Etudes et de Recherches Avicoles, Porcines et Piscicoles (LERAPP), Unité de virologie, immunologie et parasitologie aviaires et cunicoles (VIPAC), BP 53, 22440 Ploufragan, France.

2.3.13. *Maladie de Marek*

Dr V.K. Nair

Institute for Animal Health, Compton Laboratory, Compton, Berkshire RG20 7NN, Royaume-Uni.

2.3.14. *Maladie de Newcastle*

Dr D.J. Alexander

VLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, Royaume-Uni.

2.3.15. *Rhinotrachéite infectieuse de la dinde (metapneumovirus aviaires)*

Dr J. Pedersen

National Veterinary Services Laboratories,
Diagnostic Virology Laboratory, P.O. Box 844,
Ames, IA 50010, États-Unis d'Amérique.

Dr R. Gough

VLA Weybridge, New Haw, Addlestone,
Surrey KT15 3NB, Royaume-Uni.

2.4.1. *Anaplasmose bovine*

Prof. T.F. McElwain

Animal Health Research Center, College of
Veterinary Medicine, 155N Bustad Hall, P.O. Box
647034, Pullman, WA 99164-7034,
États-Unis d'Amérique.

2.4.2. *Babésiose bovine*

Dr R.E. Bock

Queensland Department of Primary Industries,
Animal and Plant Health Service, Tick Fever
Research Centre, 280 Grindle Road, Wacol,
Queensland 4076, Australie.

Dr W.K. Jorgensen & Mr J.B. Molloy

Queensland Department of Primary Industries,
Delivery, Emerging Technologies, 665 Fairfield
Rd, Yeerongpilly, Queensland 4105, Australie.

2.4.3. *Brucellose bovine*

Dr K. Nielsen

Canadian Food Inspection Agency, Animal
Diseases Research Institute, P.O. Box 11300,
Station H, Nepean, Ontario K2H 8P9, Canada.

Dr D.R. Ewalt

Pathobiology Laboratory, National Veterinary
Services Laboratories, 1800 Dayton Road, Ames,
Iowa 50010, États-Unis d'Amérique.

2.4.4. *Cysticercose bovine (voir chapitre 2.9.5.)*

Dr S. Lloyd

Department of Clinical Veterinary Medicine,
University of Cambridge, Madingley Road,
Cambridge CB3 0ES, Royaume-Uni.

2.4.5. *Campylobactériose génitale bovine*

Prof. J.A. Wagenaar

Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine,
P.O. Box 80.165, 3508 TD Utrecht, Pays-Bas.

Dr M.A.P. Van Bergen

Central Veterinary Institute of Wageningen UR,
P.O. Box 65, 8200 AB Lelystad, Pays-Bas.

2.4.6. *Encéphalopathie spongiforme bovine*

Dr D. Matthews, Dr M.M. Simmons, Mr M. Stack & Prof. G.A.H. Wells

VLA Weybridge, New Haw, Addlestone,
Surrey KT15 3NB, Royaume-Uni.

2.4.7. *Tuberculose bovine*

Dr D.V. Cousins

Australian Reference Laboratory for Bovine
Tuberculosis, Western Australia Dept of
Agriculture and Food, Locked Bag N° 4, Bentley
Delivery Centre, Bentley WA 6983, Australie.

2.4.8. *Diarrhée virale bovine*

Dr T. Drew

VLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey
KT15 3NB, Royaume-Uni.

2.4.9. *Péripneumonie contagieuse bovine*

Dr F. Thiaucourt

CIRAD-EMVT, Campus international de
Baillarguet, Montferrieux-sur-Lez, B.P. 5035, 34032
Montpellier Cedex 1, France.

2.4.10. *Dermatophilose*

Dr D. Martinez

CIRAD, Campus International de Baillarguet – TA-
A15 / G, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

2.4.11. *Leucose bovine enzootique*

Dr D. Beier (à la retraite)

Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der
Tiere, Institute für epidemiologische Diagnostik,
Seestrasse 55, 16868 Wusterhausen/Dosse,
Allemagne.

Dr T.W. Vahlenkamp

Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10,
17493 Greifswald-Insel, Allemagne.

2.4.12. *Sépticémie hémorragique*

Dr S.K. Srivastava, Dr A.A. Kumar,

Dr P. Chaudhuri & Dr M.P. Yadav

Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar
243122 U.P., Inde.

2.4.13. *Rhinotrachéite infectieuse bovine/
Vulvovaginite pustuleuse infectieuse*

Dr J.A. Kramps

Central Institute for Animal Disease Control
Lelystad (CIDC-Lelystad), P.O. Box 2004, 8203
AA Lelystad, Pays-Bas.

2.4.14. *Dermatose nodulaire contagieuse*

Dr R.P. Kitching

National Centre for Foreign Animal Disease,
1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba
R3E 3M4, Canada.

Dr V. Carn

Brewishay, Main Street, Barton St David, Dorset
DT9 6QD, Royaume-Uni.

2.4.15. *Coryza gangréneux*

Dr H.W. Reid

Moredun Research Institute, International
Research Centre, Pentlands Science Park, Bush
Loan, Penicuik EH26 0PZ, Écosse, Royaume-Uni.

2.4.16. *Theilériose*

Prof. E. Pipano

Koret School of Veterinary Medicine, The Hebrew
University of Jerusalem, P.O. Box 12 Rehovot,
Israel.

Dr S. Morzaria

FAO Regional Office for Asia and the Pacific,
39 Phra Athit Road, Bangkok 10200, Thaïlande.

Dr P. Spooner

International Livestock Research Institute,
Naivasha Road, Nairobi 00100, Kenya.

2.4.17. *Trichomonose*

Dr A.A. Gajadhar

Centre for Food-borne and Animal Parasitology,
Canadian Food Inspection Agency, 116 Veterinary
Road, Saskatoon, Saskatchewan S7N 2R3,
Canada.

Dr S. Parker

Large Animal Clinical Sciences, Western College
of Veterinary Medicine, 52 Campus Drive,
Saskatoon, Saskatchewan S7N 5B4, Canada.

Prof. M. Taylor

Veterinary Surveillance, Central Science
Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ,
Royaume-Uni.

2.4.18. *Trypanosomes (transmises par les tsé-tsé)*

Dr M. Desquesnes

Cirad-Bios, UMR177-Trypanosomes, Campus
international de Baillarguet, TA A-17 / G, 34398
Montpellier Cedex 5, France.

2.5.1. *Peste équine*

Prof. J.M. Sánchez-Vizcaíno

Catedrático del Área de Sanidad Animal,
Universidad Complutense, Facultad de
Veterinaria, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040
Madrid, Espagne.

2.5.2. *Métrite contagieuse équine*

Dr P. Heath (à la retraite)

VLA Bury St Edmunds, Rougham Hill, Bury St
Edmunds, Royaume-Uni.

Dr P.J. Timoney

Maxwell H. Gluck Equine Research Center, Dept
of Veterinary Science, University of Kentucky,
108 Gluck Equine Research Center, Lexington,
Kentucky 40546-0099, États-Unis d'Amérique.

2.5.3. *Dourine*

Dr J.B. Katz

USDA, APHIS, National Veterinary Services
Laboratories, P.O. Box 844, Ames, Iowa 50010,
États-Unis d'Amérique.

2.5.4. *Lymphangite épizootique*

Dr J. Picard

Department of Veterinary Tropical Diseases,
Faculty of Veterinary Science, University of
Pretoria, Private Bag X04, Onderstepoort 0110,
Afrique du Sud.

2.5.5. *Encéphalomyélite équine
(de l'Est et de l'Ouest)*

Dr E.N. Ostlund

USDA, APHIS, National Veterinary Services
Laboratories, P.O. Box 844, Ames, Iowa 50010,
États-Unis d'Amérique.

2.5.6. *Anémie infectieuse des équidés*

Dr J. Daly (à la retraite)

Animal Health Trust, Lanwades Park, Kentford,
Newmarket, Suffolk CB8 7UU, Royaume-Uni.

2.5.7. *Grippe équine*

Dr J.A. Mumford

Cambridge Infectious Diseases Consortium,
Department of Veterinary Medicine, Madingley
Road, Cambridge CB3 0ES, Royaume-Uni.

- 2.5.8. *Piroplasmoses équine*
Dr T. de Waal
University College Dublin, School of Agriculture,
Food Science and Veterinary Medicine, Veterinary
Sciences Centre, Belfield, Dublin 4, Irlande.
- 2.5.9. *Rhinopneumonie équine*
Dr G.P. Allen
Department of Veterinary Science,
College of Agriculture, University of Kentucky, 108
M.H. Gluck Equine Research Center, Lexington,
Kentucky 40546-0099, États-Unis d'Amérique.
- 2.5.10. *Artérite virale équine*
Dr P.J. Timoney
University of Kentucky, Department of Veterinary
Science, 108 Gluck Equine Research Center,
Lexington, Kentucky 40546-0099,
États-Unis d'Amérique.
- 2.5.11. *Morve*
Dr H. Neubauer
Friedrich-Loeffler Institut, Institut für Bakterielle
Infektionen und Zoonosen, Naumburger Strasse
96a, 07743 Jena, Allemagne.
- 2.5.12. *Gale des équidés (voir chapitre 2.9.8.)*
Dr J.L. Schlater & Dr J.W. Mertins
Parasitology and Clinical Pathology Section,
Pathobiology Laboratory, National Veterinary
Services Laboratories, USDA, APHIS, VS, P.O.
Box 844, Ames, Iowa 50010,
États-Unis d'Amérique.
- 2.5.14. *Encéphalomyélite équine vénézuélienne*
Dr E.N. Ostlund
USDA, APHIS, National Veterinary Services
Laboratories, P.O. Box 844, Ames, Iowa 50010,
États-Unis d'Amérique.
- 2.6.1. *Myxomatose*
Prof. S. Bertagnoli
École Nationale Vétérinaire, 23 Chemin de
Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse Cedex 03,
France.
- 2.6.2. *Maladie hémorragique du lapin*
Dr A. Lavazza & Dr L. Capucci
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della
Lombardia e dell'Emilia Romagna, Via Bianchi
7/9, 25124 Brescia, Italie.
- 2.7.1. *Maladie de la frontière*
Dr P.F. Nettleton & Dr K. Willoughby
Moredun Research Institute, International
Research Centre, Pentlands Science Park, Bush
Loan, Penicuik EH26 0PZ, Écosse, Royaume-Uni.
- 2.7.2. *Brucellose ovine et caprine (Brucella ovis
exclue)*
Dr B. Garin-Bastuji
EU Community/OIE & FAO Reference Laboratory
for Brucellosis, Unité Zoonoses Bactériennes,
AFSSA, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France.
- Dr J.M. Blasco**
Centro de Investigación y Tecnología
Agroalimentaria de Aragón (CITA), Apartado
727, 50080 Zaragoza, Espagne.
- 2.7.3/4. *Arthrite/encéphalite caprine et Maedi-visna*
Dr D. Knowles & Dr L.M. Herrmann
USDA-ARS, Animal Disease Research Unit, 3003
ADBF, Washington State University, Pullman,
Washington 99164-6630, États-Unis d'Amérique.

- 2.7.5. *Agalaxie contagieuse*
- Dr R. Nicholas**
VLA Weybridge, New Haw, Addlestone,
Surrey KT15 3NB, Royaume-Uni.
- Dr G.R. Loria**
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia,
Palermo, Italie.
- 2.7.6. *Pleuropneumonie contagieuse caprine*
- Dr F. Thiaucourt**
CIRAD-EMVT, Campus international de
Baillarguet, Montferriez-sur-Lez, B.P. 5035, 34032
Montpellier Cedex 1, France.
- 2.7.7. *Avortement enzootique des brebis
(Chlamydiose ovine)*
- Dr D. Longbottom**
Moredun Research Institute, International
Research Centre, Pentlands Science Park
Bush Loan, Penicuik EH26 0PZ, Royaume-Uni.
- 2.7.8. *Maladie du mouton de Nairobi (voir chapitre
2.9.1.)*
- Dr G.H. Gerdes**
Onderstepoort Veterinary Institute, Private Bag
X05, Onderstepoort 0110, Afrique du Sud.
- 2.7.9. *Épididymite contagieuse ovine (Brucella ovis)*
- Dr B. Garin-Bastuji**
EU Community/OIE & FAO Reference Laboratory
for Brucellosis, Unité Zoonoses Bactériennes,
AFSSA, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France.
- Dr J.M. Blasco**
Centro de Investigación y Tecnología
Agroalimentaria de Aragón (CITA), Apartado
727, 50080 Zaragoza, Espagne.
- 2.7.10. *Adénomatose pulmonaire ovine
(adénocarcinome)*
- Dr M.J. Sharp**
VLA, Lasswade Laboratory, Pentlands Science
Park, Bush Loan, Penicuik EH26 0PZ, Écosse,
Royaume-Uni.
- 2.7.11. *Peste des petits ruminants*
- Dr A. Diallo**
Animal Health Service, Food and Agriculture
Organization of the United Nations Viale delle
Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italie.
- 2.7.12. *Salmonellose (S. abortusovis)
(voir chapitre 2.9.9.)*
- Dr R. Davies**
VLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey
KT15 3NB, Royaume-Uni.
- 2.7.13. *Tremblante*
- Dr D. Matthews, Dr M.M. Simmons, Mr M. Stack &
Prof. G.A.H. Wells**
VLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey
KT15 3NB, Royaume-Uni.
- 2.7.14. *Clavelée et variole caprine*
- Dr R.P. Kitching**
National Centre for Foreign Animal Disease,
1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba
R3E 3M4, Canada.
- Dr V. Carn**
Brewishay, Main Street, Barton St David, Dorset
DT9 6QD, Royaume-Uni.

- 2.8.1. *Peste porcine africaine*
- Dr C.A.L. Oura**
Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory,
Ash Road, Pirbright, Surrey GU24 0NF,
Royaume-Uni.
- Dr M. Arias**
Centro de Investigación en Sanidad Animal
(CISA-INIA), Valdeolmos, 28130 Madrid,
Espagne.
- 2.8.2. *Rhinite atrophique du porc*
- Dr K.B. Register**
USDA, ARS, National Animal Disease Center,
2300 Dayton Avenue, Ames, Iowa 50010,
États-Unis d'Amérique.
- 2.8.3. *Peste porcine classique (hog cholera)*
- Dr T. Drew**
VLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey
KT15 3NB, Royaume-Uni.
- 2.8.4. *Encéphalite due au virus Nipah (voir chapitre 2.9.6.)*
- Dr P. Daniels**
Australian Animal Health Laboratory, CSIRO
Livestock Industries, 5 Portarlington Road,
Geelong, Victoria 3220, Australie.
- Dr M. Narasiman**
Veterinary Research Institute, 59, Jalan Sultan
Azlan Shah, 31400 Ipoh, Perak, Malaysie.
- 2.8.5. *Brucellose Porcine (Brucella suis)*
- Dr S. Olsen**
USDA, ARS, National Animal Disease Center,
2300 Dayton Avenue, Ames, Iowa 50010,
États-Unis d'Amérique.
- 2.8.6. *Cysticercose porcine (voir chapitre 2.9.5.)*
- Dr S. Lloyd**
Department of Clinical Veterinary Medicine,
University of Cambridge, Madingley Road,
Cambridge CB3 0ES, Royaume-Uni.
- 2.8.7. *Syndrome dysgénésique et respiratoire du porc*
- Dr L.R. Ludemann**
USDA, APHIS, Center for Veterinary Biologics,
Laboratory, P.O. Box 844, Ames, Iowa 50010,
États-Unis d'Amérique.
- Dr K.M. Lager**
Virus and Prion Diseases of Livestock Research
Unit, National Animal Disease Center,
USDA-ARS, Ames, Iowa 50010, États-Unis
d'Amérique.
- 2.8.8. *Grippe porcine*
- Dr S.L. Swenson**
National Veterinary Services Laboratories, P.O.
Box 844, Ames, Iowa 50010, États-Unis
d'Amérique.
- Dr P.L. Foley**
Center for Veterinary Biologics, 510 S. 17th St.,
Suite 104, Ames, IA 50010, États-Unis
d'Amérique.
- Dr C.W. Olsen**
Department of Pathobiological Sciences, School
of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-
Madison, 2015 Linden Drive, Madison, WI 53706,
États-Unis d'Amérique

- 2.8.9. *Maladie vésiculeuse du porc*
- Dr R.P. Kitching**
National Centre for Foreign Animal Disease,
1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba
R3E 3M4, Canada.
- Dr D. Paton**
Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory,
Ash Road, Pirbright, Surrey GU24 0NF,
Royaume-Uni.
- Dr A.I. Donaldson,**
290 London Road, Burpham, Guildford, Surrey
GU4 7LB, Royaume-Uni.
- 2.8.10. *Encéphalomyélite à Teschovirus
(anciennement encéphalomyélite à
entérovirus ou maladie de Teschen/Talfan)*
- Mr N. Knowles**
Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory,
Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF,
Royaume-Uni.
- 2.8.11. *Gastro-entérite transmissible*
- Dr L.J. Saif**
The Ohio State University, Ohio Agricultural
Research and Development Center, Food Animal
Health Research Program, 1680 Madison Avenue,
Wooster, Ohio 44691-4096,
États-Unis d'Amérique.
- 2.9.1. *Maladies animales à Bunyavirus (Fièvre de la
Vallée du Rift non comprise)*
- Dr G.H. Gerdes**
Onderstepoort Veterinary Institute, Private Bag
X05, Onderstepoort 0110, Afrique du Sud.
- 2.9.2. *Variole des camélidés*
- Dr H. Elliott**
International Animal Health Division, DEFRA,
1A Page Street, London SW1P 4PQ,
Royaume-Uni.
- Dr E. Tuppurainen**
Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory,
Ash Road, Pirbright, Surrey GU24 0NF,
Royaume-Uni.
- 2.9.3. *Campylobacter jejuni et Campylobacter coli*
- Prof. J.A. Wagenaar**
Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine,
P.O. Box 80.165, 3508 TD Utrecht, Pays-Bas.
- Dr W.F. Jacobs-Reitsma**
RIKILT Institute of Food Safety, Wageningen-UR
P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, Pays-Bas.
- 2.9.4. *Cryptosporidioses*
- Prof. H. Smith**
Scottish Parasite Diagnostic Laboratory, Stobhill
General Hospital, Glasgow G21 3UW,
Royaume-Uni.
- 2.9.5. *Cysticercoses*
- Dr S. Lloyd**
Department of Clinical Veterinary Medicine,
University of Cambridge, Madingley Road,
Cambridge CB3 0ES, Royaume-Uni.

- 2.9.6. *Maladies dues aux virus Hendra et Nipah* **Dr P. Daniels**
Australian Animal Health Laboratory, CSIRO
Livestock Industries, 5 Portarlington Road,
Geelong, Victoria 3220, Australie.
- Dr M. Narasiman**
Veterinary Research Institute, 59, Jalan Sultan
Azlan Shah, 31400 Ipoh, Perak, Malaisie.
- 2.9.7. *Listeria monocytogenes* **Dr J. Lopez**
Canadian Food Inspection Agency,
National Centre for Foreign Animal Disease,
1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba
R3E 3M4, Canada.
- 2.9.8. *Gales* **Dr J.L. Schlater & Dr J.W. Mertins**
Parasitology and Clinical Pathology Section,
Pathobiology Laboratory, National Veterinary
Services Laboratories, USDA, APHIS, VS, P.O.
Box 844, Ames, Iowa 50010,
États-Unis d'Amérique.
- 2.9.9. *Salmonelloses* **Dr R. Davies**
VLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey
KT15 3NB, Royaume-Uni.
- 2.9.10. *Toxoplasmose* **Dr D. Buxton & Dr S.W. Maley**
Moredun Research Institute, Pentlands Science
Park, Bush Loan, by Edinburgh EH26 0PZ,
Scotland, Royaume-Uni.
- 2.9.11. *Escherichia coli vérocytotoxinogène* **Dr F.A. Clifton-Hadley**
VLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey
KT15 3NB, Royaume-Uni.
- 2.9.12. *Zoonoses transmissibles depuis les primates
autres que l'homme* **FELASA¹ Working Group on Non-Human Primate
Health: H. Weber (Organisateur), E. Berge,
J. Finch, P. Heidt, F.-J. Kaup, G. Perretta,
B. Verschuere & S. Wolfensohn**
FELASA, BCM Box 2989, London WC1N 3XX,
Royaume-Uni.

1 FELASA: Federation of European Laboratory Animal Science Associations

CONTRIBUTEURS A L'ÉDITION FRANÇAISE

COORDINATION SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE DE LA TRADUCTION

Dr Pierre-Charles LEFÈVRE

Conseil général de l'Agriculture de l'alimentation
et des espaces ruraux
251, rue de Vaugirard
75015 Paris,
France
pocolo@wanadoo.fr

**EXPERTS FRANCOPHONES EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES AYANT PARTICIPÉ À LA
TRADUCTION EN FRANÇAIS DES CHAPITRES DU *MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS
AND VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS* AVEC LEUR ADRESSE PROFESSIONNELLE
AU MOMENT DES TRADUCTIONS**

Dre Marie ARCHAMBAULT

Groupe de Recherche sur les Maladies
Infectieuses du Porc
Centre de Recherche en Infectiologie Porcine
Département de Pathologie et Microbiologie
Faculté de Médecine Vétérinaire
Université de Montréal
CP 5000, 3200 rue Sicotte
Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6
Canada
marie.archambault@umontreal.ca

Dr Jacques BARRAT

AFSSA-LERPAS,
Laboratoire d'études sur la rage
et la pathologie des animaux sauvages
Domaine de Pixérécourt
BP 9, 54220 Malzéville
France
j.barrat@afssa.fr

Dre Catherine BELLOC

Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes
BP 40706, 44307 Nantes Cedex 3
France
belloc@vet-nantes.fr

Dre Anna BENCSIK

Unité ATNC / AFSSA
31 avenue Tony Garnier
69364 Lyon Cedex 07
France
a.bencsik@lyon.afssa.fr

Dr Jean BLANCOU

Directeur Général Honoraire de l'OIE
11 rue Descombes
75017 Paris
France
blancou@noos.fr

Dre Elisabeth BOIREAU

2 rue des Platières
91070 Bondoufle
France

Dr Pascal BOIREAU

Directeur AFSSA LERPAZ
23 avenue du général de gaulle
94700 Maisons Alfort
France
p.boireau@afssa.fr

Professeur Gilles BOURDOISEAU

Laboratoire de Parasitologie, Maladies parasitaires
Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
1 av. Bourgelat
69280 Marcy l'Etoile
France
g.bourdoiseau@vet-lyon.fr

Dre Anne BRISABOIS

Resp. Unité Caractérisation et Epidémiologie
bactérienne, AFSSA LERQAP
23 Avenue du Général de Gaulle
94706 Maisons-Alfort Cedex
France
a.brisabois@afssa.fr

Professeur Jeanne BRUGERE-PICOUX

Pathologie médicale du bétail et
des animaux de basse-cour
Ecole nationale vétérinaire d'Alfort
7 Avenue du Général de Gaulle
94704 Maisons-Alfort Cedex
France
jbrugere-picoux@vet-alfort.fr

Mme Marie-Pierre CALLAIT-CARDINAL

Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
Unité de Parasitologie
1 avenue Bourgelat
69 280 Marcy l'Etoile
France
mp.callait@vet-lyon.fr

M Olivier CELLE

AFSSA Sophia Antipolis
Unité Pathologie de l'abeille, Laboratoire de
Pathologie des Petits Ruminants et des Abeilles
105 route des Chappes, BP 111
06902 Sophia Antipolis
France

Professeur Jean CHANTAL

Professeur Émérite
École Nationale Vétérinaire de Toulouse
4, Allée du Château
31770 Colomiers
France
jh.chantal@free.fr

Professeur Allal DAKKAK

Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II
Département de Parasitologie et
Maladies Parasitaires
B.P. 6202 Rabat-Instituts
Maroc
a.dakkak@iav.ac.ma

Dre Véronique DUQUESNE

AFSSA Sophia Antipolis
Unité Pathologie des Petits Ruminants
105 route des Chappes, BP 111
06 902 Sophia Antipolis
France
v.duquesne@afssa.fr

Dr Nicolas ETERRADOSSI

AFSSA Ploufragan
Unité de virologie,
immunologie et parasitologie aviaires et cunicoles
BP 53, 22440 Ploufragan
France
n.etterradossi@ploufragan.afssa.fr

Professeur Jacques EUZÉBY

Professeur honoraire de parasitologie et
maladies parasitaires
École nationale vétérinaire de Lyon
Membre de l'Académie nationale de médecine
de l'Académie vétérinaire de France et de
l'Académie royale des sciences vétérinaires
d'Espagne
149 rue Vauban
69006 Lyon
France
jacques.euzeby@free.fr

Dr Jean-Paul FAUCON

AFSSA Sophia Antipolis
Unité Pathologie de l'abeille
Laboratoire de Pathologie des
Petits Ruminants et des Abeilles
105 route des Chappes, BP 111
06902 Sophia Antipolis,
France
jp.faucon@sophia.afssa.fr

Professeur Jean-Pierre GANIERE

Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes
Département Santé des animaux
d'élevage et Santé publique
Unité de Pathologie infectieuse
Atlantpole- La Chantrerie, BP 40706
44307 Nantes Cedex 03
France
ganier@vet-nantes.fr

Dr Bruno GARIN-BASTUJI

Directeur de Recherche
Centre National de Référence des Brucella
Laboratoire Communautaire de
Référence pour la Brucellose
Laboratoire National et OIE/FAO de Référence
pour la Brucellose Animale
Unité Zoonoses Bactériennes
AFSSA/LERPAZ
23 Avenue du Général-de-Gaulle
F-94706 Maisons-Alfort Cedex
France
b.garin-bastuji@afssa.fr

Dr Jean-Marie GOURREAU

AFSSA-LERPAZ
20, Av. du Général de Gaulle
94700 Maisons-Alfort
France
jm.gourreau@afssa.fr

Dre Véronique JESTIN

AFSSA/avian virology unit
National Reference Laboratory for
avian influenza and Newcastle disease
BP53, 22440 Ploufragan
France
v.jestin@ploufragan.afssa.fr

Dre Isabelle KEMPF

Agence Française de Sécurité
Sanitaire des Aliments (AFSSA)
AFSSA Site de Ploufragan BP 53
Zoopole les croix, 22440 Ploufragan
France
i.kempf@ploufragan.afssa.fr

Dre Marylène KOBISCH

AFSSA, LERAPP
Unité Mycoplasmatologie Bactériologie
BP 53, Les Croix, 22440 Ploufragan
France
m.kobisch@ploufragan.afssa.fr

Dre Gaëlle KUNTZ-SIMON

AFSSA-LERAPP
Unité Virologie Immunologie Porcines
Zoopôle Les Croix, BP 53
22440 Ploufragan,
France
g.kuntz.simon@afssa.fr

Dre Renée LAROCHELLE

957 rue de la Pommeraie
Mont-Saint-Hilaire, Québec, J3H 5E5
Canada
larocheller@videotron.ca

Dre Karine LAROUCAU

AFSSA / LERPAZ / UZB
23, avenue du Général de Gaulle
94706 Maisons-Alfort Cedex
France
k.laroucau@afssa.fr

Mme Marie-Frédérique LE POTIER

AFSSA - site de PLOUFRAGAN
Unité Virologie Immunologie Porcines
Laboratoire National de Référence
pour les Pestes Porcines
Les Croix BP 53
F 22440 Ploufragan
France
mf.lepotier@ploufragan.afssa.fr

Dre Geneviève LIBEAU

Biological Systems Department - CIRAD
Control of Exotic and Emerging
Animal Diseases (UPR15)
TA A-15/G Campus Int. Baillarguet
34398 Montpellier Cedex 5
France
genevieve.libeau@cirad.fr

Dr Michel LOMBARD

Consultant en Vaccins
22, rue Crillon
69006 Lyon
France
lombard.family@wanadoo.fr

Dr Bertrand LOSSON

Université de Liège, Faculté de médecine
vétérinaire
Laboratoire de parasitologie et pathologie
des maladies parasitaires
Boulevard de Colonster, 20 B-43
Sart Tilman, 4000 Liège
Belgique
blosson@ulg.ac.be

Dr Dominique MARTINEZ

Centre International en Recherche
Agronomique pour le Développement (CIRAD)
Département BIOS
TA-A15/G Campus International de Baillarguet
34398 Montpellier Cedex 5
France
dominique.martinez@cirad.fr

Dre Pascale MERCIER

Afssa Niort
Laboratoire d'Etudes et de Recherches Caprines
60, rue de Pied-de-Fond
BP 3081, 79012 Niort Cedex
France
p.mercier@niort.afssa.fr

Dr Gilles MEYER

Maître de Conférences
Pathologie des Ruminants
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Unité de recherches Interactions Hôtes-Virus
23 chemin des Capelles
BP87614, Toulouse Cedex 3
France
g.meyer@envt.fr

Dr Michel PÉPIN

Directeur du LERPAZ
Institut Représentative MED-VET-NET
23, avenue du Général de Gaulle
94706- Maisons-Alfort Cedex
France
Secrétariat : Viviane DOMARIN
v.domarin@afssa.fr

Dr Eric PLATEAU

Agence française de sécurité
sanitaire des aliments (AFSSA)
27 - 31 Avenue du Général Leclerc
94701 Maisons Alfort Cedex
France
e.plateau@afssa.fr

Dr François POUMARAT

Chef de l'Unité "Mycoplasmatologie"
AFSSA site de Lyon
31 av. Tony-Garnier
69364 Lyon Cedex 07
France
f.poumarat@lyon.afssa.fr

Dr François THIAUCOURT

CIRAD-EMVT
Programme Santé animale TA 30/G
Campus international de Baillarguet
34398 Montpellier Cedex 5
France
thiaucourt@cirad.fr

Professeur Etienne THIRY

Université de Liège, Faculté de Médecine
vétérinaire
Département des maladies infectieuses et
parasitaires, Virologie et maladies virales
Boulevard de Colonster, 20
bât B43b, B-4000 Liège
Belgique
etienne.thiry@ulg.ac.be

Dre Marie Françoise THOREL

Directrice de recherche (Retraîtée)
Membre Emérite de l'Association internationale pour
la paratuberculose AFSSA
Laboratoire d'Etudes et de Recherches en
Pathologie
Animale et Zoonoses, Unité des Zoonoses
bactériennes
Laboratoire de Référence pour la Tuberculose et la
Paratuberculose, ex expert
49 rue Marcel Bourdarias, 94140 Alfortville
France
mf.thorel@wanadoo.fr

Professeur Bernard TOMA

École nationale vétérinaire
7 Avenue du Général de Gaulle
94700, Maisons-Alfort
France
bftoma@vet-alfort.fr

Dr Louis TOURATIER

Secrétaire Général
Groupe ADHOC OIE/TANTG
228, Boulevard du Président Wilson
33000 Bordeaux
France
Louistier@aol.com

Dre Isabelle VALLÉE

AFSSA LERPAZ, UMR BIPAR
Biologie Moléculaire et
Immunologie Parasitaires et Fongiques
23 avenue du Général de Gaulle
94706 Maisons-Alfort
France
ivallee@vet-alfort.fr

Dre Muriel VAYSSIER-TAUSSAT

UMR 956 INRA/AFSSA
23 Avenue du Général de Gaulle
94700 Maisons-Alfort
France
mvayssier@vet-alfort.fr

Dr Christian VITU

AFSSA, BP 111
F 06902 Sophia Antipolis Cedex
France
christian.vitu@wanadoo.fr

Dr Stéphane ZIENTARA

UMR de virologie Afssa/INRA/ENVA
23 avenue de Général de Gaulle
94703 Maisons-Alfort
France
s.zientara@afssa.fr

*

* *

PARTIE 1

INFORMATION GÉNÉRALE

SECTION 1.1.

CHAPITRES D'INTRODUCTION

CHAPITRE 1.1.1.

PRÉLÈVEMENT ET EXPÉDITION DES ÉCHANTILLONS POUR LE DIAGNOSTIC

INTRODUCTION

Le point de départ des analyses au laboratoire d'une maladie animale consiste à collecter des échantillons. Ce premier chapitre d'introduction s'intéresse à des principes généraux nécessaires à l'échantillonnage, l'expédition et la conservation. Chacun des chapitres de ce Manuel terrestre, consacrés aux différentes maladies, contient des informations spécifiques à l'échantillonnage de chacune d'entre elles. Les échantillons peuvent être prélevés directement sur l'animal ou à partir de l'environnement pour de multiples raisons telles que le diagnostic d'une maladie, la surveillance du statut sanitaire, l'établissement d'un certificat sanitaire, le contrôle de l'efficacité d'un traitement ou d'un vaccin. Les échantillons collectés doivent être appropriés aux buts de l'analyse et suffisants en nombre et quantité pour permettre un résultat statistiquement valide. Les laboratoires d'analyses exigent de recevoir des échantillons qui doivent arriver dans de bonnes conditions. Pour le diagnostic des maladies, les échantillons de tissus doivent être représentatifs de ce que l'on souhaite étudier et des lésions observées. Les échantillons doivent être prélevés avec soin afin de ne pas perturber l'animal ou provoquer des lésions ; de même, aucun risque ne devra être généré pour l'opérateur. Certains échantillons doivent être prélevés de manière aseptique, et un soin doit être porté pour empêcher les contaminations croisées entre les échantillons.

Le prélèvement doit être conditionné avec soin, identifié et expédié au laboratoire par le moyen le plus rapide, avec un contrôle approprié de la température. Il existe des réglementations spécifiques pour le conditionnement et l'envoi des substances infectieuses, y compris les échantillons de diagnostic, et celles-ci doivent être appliquées. Si un prélèvement doit être expédié dans un laboratoire à l'étranger, ce laboratoire doit être consulté préalablement sur sa capacité à recevoir l'échantillon et obtenir une autorisation d'importation. Tous les échantillons doivent être accompagnés d'un courrier ou d'un formulaire d'expédition, qui contient le nom et l'adresse de l'expéditeur, la source du matériel, l'historique, l'identification de l'animal, les échantillons correspondant et les épreuves demandées.

A. COLLECTE DES ÉCHANTILLONS

Avant de collecter les échantillons, des précautions particulières doivent être apportées selon la raison pour laquelle l'échantillonnage est demandé. Cela va déterminer la nature et le nombre d'échantillons devant être prélevés pour valider les résultats d'analyse. Lorsque les échantillons sont prélevés sur un animal vivant, des précautions particulières doivent être prises afin d'éviter à l'animal toute perturbation ou lésion. L'opérateur et ses aides doivent également être à l'abri de tout risque. Il peut être nécessaire d'utiliser des systèmes de contention de l'animal, voire des tranquillisants ou des anesthésiques. Quand du matériel biologique est prélevé, que ce soit sur animal vivant ou mort, le risque de zoonose doit être pris en compte afin d'éviter des infections humaines (voir également le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries »). Les examens *post mortem* doivent être effectués dans des conditions d'asepsie autant que faire se peut. Une attention particulière doit être portée pour éviter de contaminer l'environnement ou tout risque de

dissémination d'une maladie via des insectes ou des contagions. En ce sens, des précautions doivent être prises pour l'évacuation correcte des déchets d'animaux ou de tissus.

Une attention et un soin considérables doivent être exigés pour décider du choix des échantillons qui seront envoyés au laboratoire. Les échantillons doivent être représentatifs de la maladie à étudier et des lésions observées. Doivent aussi être pris en considération, le stade de la maladie et le développement des lésions ainsi que le genre de test(s) qui seront réalisés. Fréquemment, une combinaison d'échantillons de sang pour une analyse sérologique et de tissus d'animaux morts ou euthanasiés pour une culture microbiologique et un examen histopathologique sera demandée. Des recommandations concernant le transport sont décrites plus loin dans ce chapitre.

Les chapitres concernant les maladies, dans ce *Manuel terrestre*, donnent un guide pour les échantillons qui doivent être prélevés, si bien que ces informations ne seront pas détaillées ici. De plus, des procédures pour l'échantillonnage et l'expédition ont été formulées par des organismes nationaux et internationaux (3, 5, 9, 11, 12). Ces publications fournissent des recommandations détaillées sur les échantillons spécifiques qui doivent être prélevés sur des espèces différentes et sur une large variété de maladies suspectées. Elles donnent également des informations sur les procédures *post mortem*, les listes de milieux adéquats, et les instructions sur l'expédition des échantillons. Le laboratoire qui effectuera le(s) épreuve(s) doit être contacté s'il existe des questions concernant le type d'échantillon qui doit être prélevé.

1. Prélèvement d'échantillons sur animaux vivants

a) Sang

Des prélèvements de sang peuvent être réalisés pour hématologie, pour mise en culture et/ou un examen direct pour identifier des bactéries, virus ou protozoaires auxquels cas, on ajoutera un anticoagulant comme l'acide tétra-acétique éthylène diamine (EDTA) ou de l'héparine. Si une sérologie est effectuée, l'échantillon de sang sera réalisé sur tube sec pour coagulation. Du plasma peut également être utilisé dans certaines analyses. L'échantillon de sang doit être prélevé le plus stérilement possible par ponction veineuse. On utilisera chez les grands mammifères la veine jugulaire ou une veine caudale. Les veines de la glande mammaire ou des membres peuvent également être utilisées. Les veines caves peuvent aussi être utilisées chez les porcs. Chez les oiseaux, la veine alaire (veine brachiale) est généralement utilisée. Consulter les références 1 et 6 pour les méthodes de collecte du sang chez les petits animaux de laboratoires. L'échantillon de sang est prélevé au moyen d'une seringue et d'une aiguille ou à l'aide d'une aiguille reliée à une pompe à vide au moyen d'une tubulure (cette méthode n'est pas aisée pour les veines fines, mais donne de bons résultats pour les veines de gros calibre). De petites quantités de sang peuvent être obtenues facilement par picotements avec une aiguille triangulaire à pointe solide. La peau à l'endroit de la ponction veineuse sera rasée (ou plumée) puis désinfectée avec de l'alcool à 70 % avant d'être séchée.

Pour les échantillons prélevés sur anticoagulant, il est nécessaire d'homogénéiser par agitation douce le plus vite possible le prélèvement réalisé. Il peut être nécessaire de réaliser un frottis sur une lame de microscope à l'aide de sang frais ; un frottis épais ou un frottis fin peuvent être préparés. Pour les réactions de polymérisation en chaîne (PCR), l'EDTA est l'anticoagulant de choix. Pour un échantillon de sérum, le prélèvement est laissé à température ambiante (tout en étant protégé d'une température excessive chaude ou froide) pendant 1 à 2 h jusqu'au début de la rétraction du caillot. Le caillot est retiré par la suite avec une tige ou pipette stérile et le tube est conservé avec le sérum au réfrigérateur à 4 °C. Après plusieurs heures, ou une nuit, l'échantillon peut être centrifugé à 1 000 *g* pendant 10 à 15 min et le sérum peut être décanté ou prélevé avec une pipette. Afin d'établir les variations du titre en anticorps, des échantillons de sérum doivent être prélevés en double, souvent entre 7 et 14 jours d'intervalle. Une méthode alternative à l'échantillonnage et le transport de sang destiné à un examen sérologique consiste à déposer une goutte de sang sur un papier filtre. Le sang est séché à température ambiante et l'échantillon peut être envoyé non réfrigéré. Le laboratoire doit être contacté pour s'assurer que cette méthode de collecte est valide pour les épreuves à effectuer.

b) Fèces

Au moins 10 g de fèces fraîchement émises doivent être sélectionnées. Les fèces destinées à un examen parasitologique doivent remplir le tube et arriver au laboratoire en 24 h. Si les temps de transports risquent de se prolonger au-delà de 24 h, alors les prélèvements doivent être envoyés sur de la glace ou réfrigérés pour empêcher l'éclosion des œufs de parasites. Des récipients à bouchons vissés ou des sacs plastiques stériles doivent être utilisés pour l'expédition ; il faut éviter d'utiliser des tubes avec des bouchons de caoutchouc car les gaz générés peuvent provoquer une expulsion du bouchon, détruisant ainsi l'intégrité de l'échantillon et contaminant les autres échantillons dans le paquet. Une méthode alternative qui est parfois préférable, consiste à introduire dans le rectum (ou cloaque) un écouvillon en prenant soin que l'écouvillon entre au contact de la muqueuse. L'écouvillon doit être visiblement recouvert de matière fécale, mais même

dans ce cas, l'échantillon n'est pas adapté pour un examen parasitologique. Ce type de prélèvement doit être effectué avec prudence afin de ne pas blesser les petits animaux fragiles ou les oiseaux ; de petits écouvillons sont commercialisés et doivent être utilisés. Les écouvillons peuvent être transportés en milieu de transport approprié. Les fèces se conservent et se transportent très bien à 4 °C.

c) Peau

Lors de maladie produisant des lésions vésiculeuses, un prélèvement de 2 g de tissu épithélial affecté est effectué aussi aseptiquement que possible et placé dans 5 ml d'un tampon phosphate à la glycérine ou dans un milieu de transport pour virus (bouillon de tryptose tamponné avec du Tris) à pH 7,6. De même un prélèvement de liquide de vésicules peut être effectué si celles-ci ne sont pas rompues ; si cela est possible, le liquide des vésicules doit être aspiré avec une seringue et conservé séparément dans un tube stérile. Des échantillons de poils ou de laine sont utiles pour la recherche d'acariens, de poux et les mycoses. Des raclages cutanés profonds, en utilisant le fil d'une lame de scalpel sont utiles pour les acariens fouisseurs, et, pour les oiseaux, les (racines) pointes des plumes peuvent être prélevées pour une détection d'antigènes viraux lorsque la maladie de Marek est suspectée.

d) Tractus génital et sperme

Des échantillons sont réalisés par lavage vaginal ou préputial, ou par écouvillonnage. Des écouvillonnages du col utérin ou de l'urètre peuvent être réalisés. Des échantillons de sperme sont obtenus plus facilement en utilisant un vagin artificiel ou une extrusion du pénis et une stimulation artificielle. La fraction riche en sperme doit être présente dans l'échantillon et une contamination sera évitée par des lavages en solutions antiseptiques. Un milieu de transport spécifique est souvent exigé.

e) Œil

Un prélèvement de la conjonctive peut être réalisé en maintenant la paupière et en raclant délicatement la surface. L'écouvillon est ensuite placé dans un milieu de transport. Un raclage peut être effectué sur une lame de microscope. Les manches des écouvillons ayant un manche métallique sont pratiques pour prélever suffisamment de cellules pour l'examen microscopique. Les sécrétions nasales et lacrymales mucopurulentes sont rarement utiles.

f) Jetage nasal (salive et liquide lacrymal)

Des échantillons peuvent être prélevés avec des écouvillons en dacron, en coton ou avec une gaze, préférentiellement fixés sur une tige métallique car le bois n'étant pas flexible pourrait se rompre. Il peut être utile d'humidifier préalablement l'écouvillon avec le milieu de transport. Les écouvillons doivent être en contact avec les sécrétions pendant 1 min, puis ils sont placés dans un milieu de transport et envoyés immédiatement au laboratoire à la température de 4 °C. Des écouvillons à longs manches protégés pour prélèvements nasopharyngés peuvent être utilisés lors de suspicion de quelques maladies virales.

g) Lait

Des échantillons de lait doivent être prélevés après lavage et séchage de l'extrémité du trayon, mais les antiseptiques doivent être évités à cette étape. Le premier jet de lait doit être éliminé et un tube est rempli avec le lait qui est tiré par la suite. Un échantillon du réservoir de lait peut être utile dans certaines épreuves. Le lait destiné à des épreuves sérologiques ne doit pas avoir été congelé, chauffé ou soumis à des agitations violentes. S'il y a un certain délai dans l'expédition au laboratoire, des conservateurs peuvent être ajoutés dans les échantillons de lait destinés à une analyse sérologique. Si cela est nécessaire, le lait prélevé en vue d'une analyse bactériologique pourra être congelé.

2. Prélèvement d'échantillons à l'autopsie

Des échantillons de tissus provenant d'une grande variété d'organes peuvent être prélevés en post-mortem. Les procédures détaillées pour effectuer un examen *post mortem* et la collecte d'échantillons sont décrites dans la plupart des livres de pathologie ; un guide sur les procédures d'autopsie a été publié (10). Les techniques *post mortem* sont également incluses dans quelques guides nationaux (3, 5, 9). Un résumé de ces procédures est indiqué ci-dessous.

Le personnel travaillant en santé animale doit être entraîné selon les procédures correctes pour l'examen *post mortem* des espèces animales sur lesquelles il travaille. L'équipement exigé dépendra de la taille et de l'espèce animale, mais un couteau, une scie et un couperet seront nécessaires, ainsi qu'un scalpel, des pinces et des ciseaux (y compris des ciseaux à pointe arrondie sur l'une des lames pour ouvrir les intestins). Une multitude de récipients appropriés à la nature de l'échantillon exigé et de tubes de milieu de transport doivent être disponibles, avec des étiquettes et des formulaires. Les récipients doivent être identifiés avec la date, le tissu et l'identité de l'animal. Des milieux spéciaux peuvent être nécessaires pour le transport d'échantillons de terrain. L'opérateur

doit porter des vêtements de protection : une blouse, un tablier lavable, des gants et des bottes en caoutchouc. De plus, si les maladies étudiées sont potentiellement zoonotiques, l'examen *post mortem* doit être effectué sous une hotte de sécurité biologique ; si cela n'est pas possible, un masque efficace pour le visage et une protection des yeux doivent être portés. Si la rage ou une encéphalopathie spongiforme transmissible (EST) sont suspectées, il est préférable de détacher la tête de l'animal.

Les prélèvements de tissu peuvent être réalisés pour une mise en culture microbiologique, parasitologique, une étude biochimique, un examen histopathologique et/ou immunohistochimique et également pour la détection de protéines ou d'acides nucléiques génomiques. En outre, des écouvillonnages des muqueuses buccale, oro-pharyngée ou rectale (ou du cloaque) peuvent être effectués. La personne opérant le prélèvement de tissu doit être exercée aux techniques d'autopsie et connaître suffisamment l'anatomie et la maladie étudiée pour sélectionner les bons prélèvements d'organe et un échantillonnage des lésions les plus intéressantes. Chaque pièce de tissu doit être placée dans un sac plastique séparé et parfaitement identifié et les écouvillons sont placés dans un récipient à vis stérile. Les écouvillons doivent toujours être envoyés dans des milieux de transport appropriés. Des instruments stériles doivent être utilisés pour collecter les échantillons destinés à la culture microbiologique et un soin particulier doit être porté pour éviter la contamination des tissus par le contenu intestinal. Des désinfectants ne doivent pas être utilisés sur ou à proximité des tissus destinés à la culture bactérienne ou l'isolement viral.

Les prélèvements peuvent être envoyés secs au laboratoire ou en milieu de transport pour bactérie ou virus en fonction de du type de prélèvement et de l'examen exigé ; les écouvillons doivent toujours être envoyés dans des milieux de transport appropriés. Après la collecte, les échantillons pour examens microbiologiques doivent être réfrigérés jusqu'à leur expédition. Si l'expédition ne peut être faite sous 48 h, les échantillons doivent être congelés ; cependant, une conservation prolongée à -20°C peut nuire à l'isolement du virus. Pour l'histologie, des cubes de tissus ayant une épaisseur d'au plus 0,5 cm et une longueur de 1 à 2 cm sont coupés et placés dans un tampon à pH neutre contenant 4 à 10 % de formol ; le volume du fixateur doit être au moins égal à 10 fois le volume de la pièce anatomique. Lors de suspicion de certaines maladies, il est nécessaire de réaliser de plus larges prélèvements de tissu cérébral ; le cerveau est sectionné selon une coupe sagittale, la moitié est envoyée fraîche sur de la glace, l'autre est conservée en tampon formol à 10 %. Dans le cas de tremblante, d'encéphalopathie spongiforme bovine et d'autres EST, des détails concernant la collecte des échantillons sont donnés dans les chapitres individuels de ces maladies dans ce *Manuel terrestre*. Les tissus fixés dans du formol doivent être conservés et emballés séparément des tissus frais, du sang et des frottis. Lorsque les tissus sont fixés, le formol peut être éliminé et, dans la mesure où ils sont conservés hydratés et protégés (par exemple en les enveloppant dans des serviettes en papier imprégnées de formol, enfermés hermétiquement dans un flacon à vis), ils peuvent être expédiés au laboratoire sans formol.

3. Environnement et alimentation

Des échantillons peuvent être réalisés pour contrôler l'hygiène ou dans le cadre d'une enquête lors de maladies. Des échantillons de l'environnement peuvent être prélevés à partir de la litière ou literie dépourvu de fèces ou d'urine. Des prélèvements peuvent être pris à la surface des conduits de ventilation, des siphons et des canalisations. Ce genre d'échantillonnage est particulièrement important dans les couvoirs, les centres d'insémination artificielle et les abattoirs où des équipements spécialisés sont entretenus. Enfin des échantillons peuvent être prélevés dans la nourriture des animaux, les abreuvoirs ou les grands récipients. L'eau sera prélevée dans les abreuvoirs, les auge, les réservoirs ou dans les réserves naturelles ou artificielles.

4. Les abeilles

Les abeilles adultes, mortes ou à l'agonie, peuvent être collectées à proximité des colonies. Les abeilles vivantes doivent être tuées par le froid. Des échantillons de progénitures sont prélevés en enlevant un morceau de rayons de couvain présentant des anomalies. Ces prélèvements doivent être emballés dans du papier et placés dans une boîte pour être transportés au laboratoire. Des débris de ruche peuvent être collectés pour examen, de préférence sur une planchette collante de façon à piéger les parasites mobiles.

B. TAILLE DE L'ÉCHANTILLON

Lorsque l'on étudie un cas clinique de maladie, les échantillons collectés doivent être représentatifs de la maladie étudiée et des lésions observées. Lorsque l'on met en place un programme de surveillance et de contrôle en santé animale en l'absence de cas cliniques de la maladie, quelques règles statistiques générales d'échantillonnage doivent être utilisées. Des méthodes d'échantillonnage sont nécessaires pour réaliser les enquêtes scientifiques spécifiées dans le *Code sanitaire pour les animaux terrestres* (14). Il est possible de calculer combien d'animaux doivent être prélevés à partir du troupeau ayant une certaine taille pour obtenir une probabilité de 95 % de détection de l'infection ou une exposition précédente en partant d'un certain pourcentage connu de la maladie. La formule suivante peut donner un chiffre approximatif mais un programme

d'échantillonnage spécifique pour l'enquête de surveillance prévue doit être basé sur des formules complètes disponibles dans les références (2, 4) ou par l'utilisation d'un programme (FreeCalc) disponible sur internet à l'adresse suivante : http://www.ausvet.com.au/content.php?page=res_software#freecalc. Tous les exemples de calcul présentés dans les paragraphes suivants peuvent être effectués en utilisant FreeCalc. Ce logiciel comprend aussi « un calculateur de prévalences regroupées » qui calcule la prévalence lorsque des échantillons mélangés sont utilisés.

La formule ci-dessous permet de calculer la taille n de l'échantillon pour détecter au moins une infection avec une épreuve présentant une sensibilité et une spécificité de 100 % ; où a est le niveau significatif et $1-a$ est le niveau de confiance, p est la prévalence dans la population. Si la maladie est présente chez 5 % du troupeau qui a une taille de 500 têtes, il sera nécessaire de prélever des échantillons sur 56 animaux pour obtenir avec une probabilité de 95 % au moins un résultat positif, en supposant que la sensibilité et la spécificité de l'épreuve sont de 100 %. Afin de prédire la prévalence de la maladie, il est indispensable que les échantillons soient sélectionnés dans la population par une procédure aléatoire. Comme la plupart des épreuves de diagnostic ne présentent pas une sensibilité et une spécificité de 100 %, le nombre d'échantillons à collecter doit être ajusté en fonction de la sensibilité et de la spécificité de l'épreuve qui sera utilisée (voir également Chapitre 1.1.4., « Principes de la validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses »).

$$n = \frac{\ln(a)}{\ln(1-p)}$$

Dans l'exemple ci-dessus $a = 0,05$, $1-a = 95 \%$, $p = 0,05$ et $n = 59$

Si la sensibilité (Se) est inférieure à 100 %, la formule ci-dessus doit être modifiée de la façon suivante :

$$n = \frac{\ln(a)}{\ln(1-p \cdot Se)}$$

Dans l'exemple ci-dessus avec $a = 0,05$, $p = 0,05$, une spécificité (Sp) = 1 et $Se = 0,95$, un minimum de $n = 62$ animaux au lieu de 59 devront être analysés pour obtenir une probabilité d'au moins 0,95 de trouver un animal positif. L'augmentation de la taille de l'échantillonnage de 59 à 62 est due à la diminution de la sensibilité de l'épreuve de 1 à 0,95. Le graphique ci-dessous donne la taille minimale nécessaire pour trouver au moins un animal positif pour plusieurs combinaisons de sensibilité et de prévalence à $a = 0,05$ et $Sp = 1$.

Si l'épreuve présente une spécificité inférieure à 1, les résultats positifs doivent être confirmés par une épreuve ayant une spécificité supérieure. Si la prévalence est très faible et l'épreuve utilisée a une spécificité inférieure à 1, il est vraisemblable qu'un résultat positif de l'épreuve soit un faux positif.

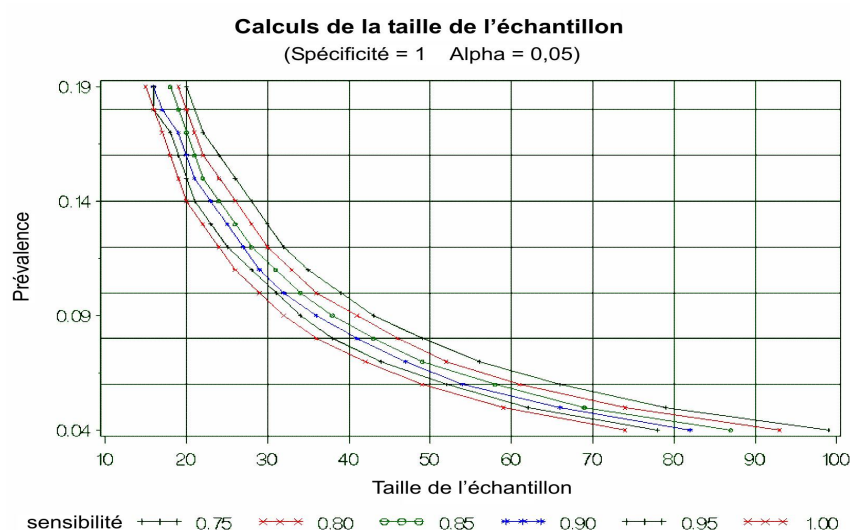


Figure 1 : Taille minimale de l'échantillon nécessaire pour détecter une maladie avec une probabilité de 95 % selon des combinaisons variables de sensibilité et de prévalence.

C. INFORMATIONS DEVANT ACCOMPAGNER L'ÉCHANTILLON

Il est essentiel que les échantillons individuels soient clairement identifiés avec des méthodes appropriées. La signalisation doit pouvoir résister aux conditions d'utilisation, par exemple l'humidité ou la congélation (utiliser des stylos marqueurs indélébiles). Les crayons ont tendance à déteindre et les étiquettes collées au plastique tombent lorsque les emballages sont conservés à -70°C . Des informations décrivant le cas et son historique doivent toujours accompagner les échantillons au laboratoire. Elles doivent être placées de façon optimale dans une enveloppe plastifiée à l'extérieur du récipient d'expédition. Comme cela est souligné dans la section suivante sur le transport des échantillons, ces informations doivent aussi figurer à l'intérieur du colis d'expédition. Les indications ci-dessous sont des points qui doivent être signalés. Il est préférable de contacter le laboratoire de réception pour déterminer s'il possède un formulaire de soumission qu'il souhaite recevoir avec l'échantillon ou s'il a besoin d'autres informations.

- i) Nom et adresse du propriétaire/exploitant et géolocalisation (latitude et longitude, si disponibles) où est apparue la maladie avec numéros de téléphone et de fax ;
- ii) Nom, adresses postale et électronique, numéros de téléphone et de fax de l'expéditeur ;
- iii) Maladie(s) suspectée(s) et analyses demandées ;
- iv) Espèce animale, race, sexe, âge et identité de chaque animal prélevé ;
- v) Date à laquelle les échantillons ont été prélevés et envoyés ;
- vi) Liste des échantillons soumis avec les milieux de transport utilisés ;
- vii) Un historique complet sera utile au laboratoire et doit être inclus si possible. Quelques uns des points de l'historique sont :
 - a) Une liste et une description des animaux examinés et les résultats de l'examen *post mortem* ;
 - b) Durée pendant laquelle les animaux malades sont restés à l'exploitation, s'il y a eu des arrivées récentes, et leur origine ;
 - c) Date du premier cas, des cas suivants ou des pertes, avec les références des précédentes soumissions ;
 - d) Description de l'étendue de l'infection dans le troupeau ou la bande ;
 - e) Nombre d'animaux dans l'exploitation, nombre d'animaux morts, nombre d'animaux présentant une manifestation clinique, leur âge, leur sexe et leur race ;
 - f) Signes cliniques et durée en incluant la température des animaux malades, l'état de la bouche, des yeux, des sabots, et des données concernant la production de lait ou d'œufs ;
 - g) Type et norme d'élevage en décrivant le type d'alimentation, les toxiques possibles et les plantes vénéneuses pouvant entrer en contact avec les animaux ;
 - h) L'historique des voyages à l'étranger du propriétaire ou de l'introduction d'animaux provenant d'autres pays ou régions ;
 - i) Liste des médicaments éventuellement donnés et date de leur administration ;
 - j) Liste des vaccinations réalisées et dates de vaccination ;
 - k) Autres observations sur la maladie, les pratiques d'élevage et les autres maladies éventuellement présentes.

D. EMBALLAGE ET TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

1. Agrément d'expédition d'échantillons

Le laboratoire qui recevra les échantillons doit être contacté pour s'assurer qu'il a la capacité de faire l'analyse demandée et de savoir s'il y a un emballage particulier ou des conditions d'expédition. Il est essentiel de prendre contact avec le laboratoire de réception lorsque le matériel est destiné à un autre pays. Une licence spéciale d'importation est habituellement exigée et doit être obtenue à l'avance pour tout produit biologique. Cette licence doit être placée dans une enveloppe à l'extérieur du colis.

Les envois doivent être effectués en accord avec la réglementation des produits dangereux en fonction du mode de transport choisi. Pour les transports aériens, il s'agit des instructions techniques de l'Organisation internationale de l'aviation civile (ICAO pour *International Civil Aviation Organization*) pour le transport en toute

sécurité des produits dangereux par voie aérienne. Elles sont reportées dans le Règlement de l'Association des transports aériens internationaux (IATA pour *International Air Transport Association*) des Produits Dangereux qui est l'interprétation des instructions de l'ICAO appliquée aux envois aériens (7). Ces règlements sont détaillés dans une publication de l'Organisation Mondiale de la Santé (13). L'expéditeur est responsable du contrôle des mises à jour des instructions pour s'assurer que les restrictions sont respectées.

2. Transport des échantillons

Les échantillons doivent être transmis au laboratoire par la méthode la plus rapide disponible. S'ils peuvent arriver au laboratoire en moins de 48 h, les échantillons sont envoyés réfrigérés. Si de la glace carbonique est utilisée, les exigences supplémentaires concernant l'emballage doivent être respectées. Les substances infectieuses, qui peuvent inclure les échantillons de diagnostic, ne sont pas autorisées en tant que bagage enregistré ou bagage à main et doivent être envoyées en soute.

3. Emballage

L'expéditeur doit s'assurer que les échantillons sont emballés afin d'arriver au laboratoire dans de bonnes conditions et qu'il n'y a pas de pertes au cours du transport. La Réglementation des produits dangereux (DGR pour *Dangerous Goods Regulations*) a des directives explicites pour l'emballage et l'envoi des échantillons de diagnostic, par tous les moyens commerciaux de transports aériens (7, 13). Dans quelques pays, des directives similaires s'appliquent aux envois terrestres et aux services postaux, mais ces directives doivent être vérifiées avant l'envoi. Les directives pour le transport aérien sont détaillées dans les publications de l'IATA, qui sont actualisées tous les ans. L'expéditeur doit connaître et suivre les procédures décrites dans la DGR actuelle. Ce qui suit est un résumé de la réglementation au moment de la révision de ce *Manuel terrestre* révisé et ne peut être utilisé comme un guide d'expédition. Les expéditeurs doivent également toujours vérifier la dernière version de l'IATA DGR avant l'envoi d'échantillons. De plus, trois des directives nationales donnent des indications explicites pour l'emballage et l'envoi d'échantillons et sont basées sur les exigences de l'IATA (3, 5, 9).

La DGR indique les procédures pour l'envoi de substances infectieuses, qui peuvent inclure les échantillons de diagnostic. Les substances infectieuses sont définies dans la DGR comme des substances connues ou raisonnablement supposées contenir des agents pathogènes. Les agents pathogènes sont définis comme des microorganismes (incluant les bactéries, les virus, les rickettsies, les parasites, les champignons) ou des microorganismes recombinés (hybride ou mutant) connus ou raisonnablement supposés être responsables de maladies humaines ou animales.

L'IATA (7, 13) a dressé la liste des exemptions à la Réglementation des produits dangereux :

- 3.6.2.2.3.1 Les substances qui ne contiennent pas de substances infectieuses ou les substances qui ne sont pas susceptibles de causer des maladies chez l'humain ou l'animal ne sont pas soumises à cette réglementation à moins qu'elles ne répondent aux critères d'inclusion dans d'autres classes de substances réglementées.
- 3.6.2.2.3.2 Les substances contenant des microorganismes qui ne sont pas pathogènes pour les humains ou les animaux ne sont pas soumises à cette réglementation à moins qu'elles ne répondent aux critères d'inclusion dans d'autres classes de substances réglementées.
- 3.6.2.2.3.3 Les substances qui ont été traitées de telle sorte que les agents pathogènes ont été neutralisés ou inactivés si bien qu'ils ne constituent plus un risque ne sont pas soumises à cette réglementation à moins qu'elles ne répondent aux critères d'inclusion dans d'autres classes de substances réglementées.
- 3.6.2.2.3.4 Les échantillons environnementaux (cela inclut les échantillons de nourritures et d'eau), qui ne sont pas considérés faire courir un risque significatif d'infection, ne sont pas soumis à cette réglementation à moins qu'ils ne répondent aux critères d'inclusion dans d'autres classes de substances réglementées.
- 3.6.2.2.3.5 Les gouttes de sang séché, collectées par le dépôt d'une goutte de sang sur un matériel absorbant, et le sang ou des composés de sang qui ont été collectés à des fins de transfusion ou de préparation de produits sanguins destinés à des transfusions ou transplantations et tous les tissus ou organes destinés à une utilisation en transplantation.
- 3.6.2.2.3.6 Les échantillons provenant de patients pour lesquels il y a une probabilité faible que des agents pathogènes soient présents, ne sont pas soumis à cette réglementation si l'échantillon est transporté dans un emballage prévenant toute fuite et sur lequel est inscrite la mention appropriée suivante : « Échantillon humain sain » ou « Échantillon animal sain ». L'emballage doit remplir les conditions suivantes :

- (a) *L'emballage doit être constitué de 3 éléments :*
 - (1) *d'un ou de plusieurs réceptacles étanche(s) (conditionnement primaire) ;*
 - (2) *d'un emballage secondaire étanche ; et*
 - (3) *enfin, entourant le tout, d'un emballage extérieur d'une résistance proportionnée au volume, au poids et au transport envisagé, d'une surface minimale toutefois de 100 mm × 100 mm ;*
- (b) *Pour les liquides, il faut en outre prévoir un matériel absorbant entre le(s) réceptacle(s) et l'emballage étanche, en quantité suffisante pour être capable d'absorber la totalité du contenu afin que durant le transport, la substance liquide ne puisse jamais atteindre l'emballage extérieur en cas de libération ou de fuite et que l'intégrité du matériel de bourrage ne soit jamais compromise ;*
- (c) *Lorsque, pour le conditionnement primaire, plusieurs réceptacles fragiles sont placés dans un unique emballage secondaire, ceux-ci doivent être soit individuellement protégés soit séparés afin de prévenir tout contact entre eux.*

« **Note** : Pour déterminer si l'échantillon d'un patient a une faible probabilité de comporter des agents pathogènes et cela dans le cadre de l'une des exemptions énumérées ci-dessus, le jugement d'un professionnel est nécessaire. Ce jugement doit être basé sur une connaissance de l'historique médical, des symptômes et des circonstances individuelles touchant à la source, humaine ou animale, et des conditions endémiques locales. Par exemple, les échantillons qui peuvent être transportés sous ce paragraphe incluent ceux nécessaires pour réaliser les tests sanguins ou d'urine permettant de surveiller le taux de cholestérol, la concentration sanguine de glucose, des hormones ou des anticorps spécifiques de la prostate (PSA pour Prostate Specific Antibodies) ; les tests permettant de surveiller les fonctions d'organes tels que le cœur, le foie ou les reins chez les humains ou les animaux sans maladies infectieuses ; les tests pour surveiller les traitements médicamenteux, ou encore les tests effectués dans le cadre d'une assurance ou d'un emploi qui sont réalisés pour vérifier la présence d'alcool ou de certains médicaments ; les tests de grossesse ; les biopsies pour détecter un cancer, et les tests enfin pour détecter des anticorps chez les humains ou les animaux. »

Il existe également des exceptions pour quelques produits biologiques et l'expéditeur de ces produits doit se référer à la réglementation de l'IATA pour ces directives puisque quelques produits biologiques ne sont pas exemptés. La définition de la DGR pour les produits biologiques est la suivante (7, 13) :

« Les produits biologiques sont dérivés d'organismes vivants. Ils sont fabriqués et distribués en accord avec les directives des autorités gouvernementales nationales appropriées, qui peuvent avoir des directives de licences spéciales, et sont utilisées soit pour la prévention, le traitement, ou le diagnostic de maladies humaines ou animales, ou pour le développement, des sujets expérimentaux ou de recherche liés à cela. Ils comprennent, mais n'y sont pas limités, les produits finis ou non finis tels que les vaccins. »

La DGR déclare que les substances infectieuses (comprenant les échantillons de diagnostic supposés contenir des pathogènes animaux ou humains) sont désignées comme Catégorie A et B et assignées à UN 2814, UN 2900 ou UN 3373.

La Catégorie A est définie comme une : « *Substance infectieuse, qui est transportée dans une forme où lorsqu'il y a une exposition, est capable de provoquer une invalidité permanente, une maladie grave ou fatale chez des hommes ou animaux sains, les exemples des substances qui correspondent à ces critères sont donnés dans les tableaux 1 et 2* ». Les substances infectieuses qui correspondent à cette définition affectant les humains, incluant les agents zoonotiques, sont désignées UN 2814 et portent le nom d'expédition de « **Substance infectieuse, affectant l'Homme** », celles qui affectent seulement les animaux sont désignées UN2900 et reçoivent le nom d'expédition de « **Substance infectieuse, affectant les animaux** ».

Les substances infectieuses envoyées à des fins de diagnostic qui ne répondent pas aux critères pour une désignation par UN 2814 ou UN 2900 sont assignées à la Catégorie B et doivent être assignées à UN 3373 et désignée comme « **ÉCHANTILLONS DE DIAGNOSTIC ou ÉCHANTILLONS CLINIQUES ou SUBSTANCES BIOLOGIQUES DE CATÉGORIE B** ».

La DGR de l'IATA contient une liste indicative des pathogènes qui doivent être assignés à UN 2814 ou UN 2900 (Tableaux 1 et 2). Les agents pathogènes de cette liste ne peuvent pas être assigné à UN 3373 (7, 13).

Tableau 1. Substances infectieuses affectant les humains qui doivent être assignées à UN 2814

<i>Bacillus anthracis</i> (cultures uniquement)	Virus de l'encéphalite japonaise (cultures uniquement)
<i>Brucella abortus</i> (cultures uniquement)	Virus Junin
<i>Brucella melitensis</i> (cultures uniquement)	Virus de la maladie de la forêt de Kyasanur
<i>Brucella suis</i> (cultures uniquement)	Virus Lassa
<i>Burkholderia mallei</i> – <i>Pseudomonas mallei</i> – Morves (cultures uniquement)	Virus Machupo
<i>Burkholderia pseudomallei</i> – <i>Pseudomonas pseudomallei</i> (cultures uniquement)	Virus Marburg
<i>Chlamydia psittaci</i> – souches aviaires (cultures uniquement)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (cultures uniquement)
<i>Clostridium botulinum</i> (cultures uniquement)	Virus variole simien
<i>Coccidioides immitis</i> (cultures uniquement)	Virus Nipah
<i>Coxiella burnetii</i> (cultures uniquement)	Virus de la fièvre hémorragique Omsk
Virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo	Poliovirus (cultures uniquement)
Virus de la dengue (cultures uniquement)	Virus de la rage (cultures uniquement)
Virus de l'encéphalite équine Est (cultures uniquement)	<i>Rickettsia prowazekii</i> (cultures uniquement)
<i>Escherichia coli</i> , verotoxigénique (cultures uniquement)	<i>Rickettsia rickettsii</i> (cultures uniquement)
Virus de l'Ebola	Virus de la Vallée du Rift (cultures uniquement)
Virus Flexal	Virus de l'encéphalite verno-estivale russe (cultures uniquement)
<i>Francisella tularensis</i> (cultures uniquement)	Virus Sabia
Virus Guanarito	Dysentérie causée par <i>Shigella</i> type 1 (cultures uniquement)
Virus Hantaan	Virus de l'encéphalite à tiques (cultures uniquement)
Hantavirus causant une fièvre hémorragique accompagné d'un syndrome rénal	Virus de la variole
Virus Hendra	Virus de l'encéphalite équine du Venezuela (cultures uniquement)
Virus de l'hépatite B (cultures uniquement)	Virus West Nile (cultures uniquement)
Virus de l'herpès B (cultures uniquement)	Virus de la fièvre jaune (cultures uniquement)
Virus d'immunodéficience humaine (cultures uniquement)	<i>Yersinia pestis</i> (cultures uniquement)
Virus de l'influenza aviaire hautement pathogène (cultures uniquement)	

Tableau 2. Exemples indicatifs d'agents pathogènes animaux interdits comme échantillons de diagnostic qui doivent être expédiés comme substances infectieuses affectant les animaux (UN 2900)

Virus de la peste porcine africaine (cultures uniquement)	Virus de la peste des petits ruminants (cultures uniquement)
Paramyxovirus aviaire de Type 1 – Virus de la Maladie de Newcastle (cultures uniquement)	Virus de la peste bovine (cultures uniquement)
Virus de la peste porcine classique (cultures uniquement)	Virus de la clavelée (cultures uniquement)
Virus de la fièvre aphteuse (cultures uniquement)	Virus de la variole caprine (cultures uniquement)
Virus de la dermatose nodulaire contagieuse (cultures uniquement)	Virus de la maladie vésiculeuse du porc (cultures uniquement)
<i>Mycoplasma mycoides</i> – Péripleumonie contagieuse bovine (cultures uniquement)	Virus de la stomatite vésiculeuse contagieuse (cultures uniquement)

Tout agent pathogène nouveau ou émergent doit également être assigné à UN 2814 ou UN 2900.

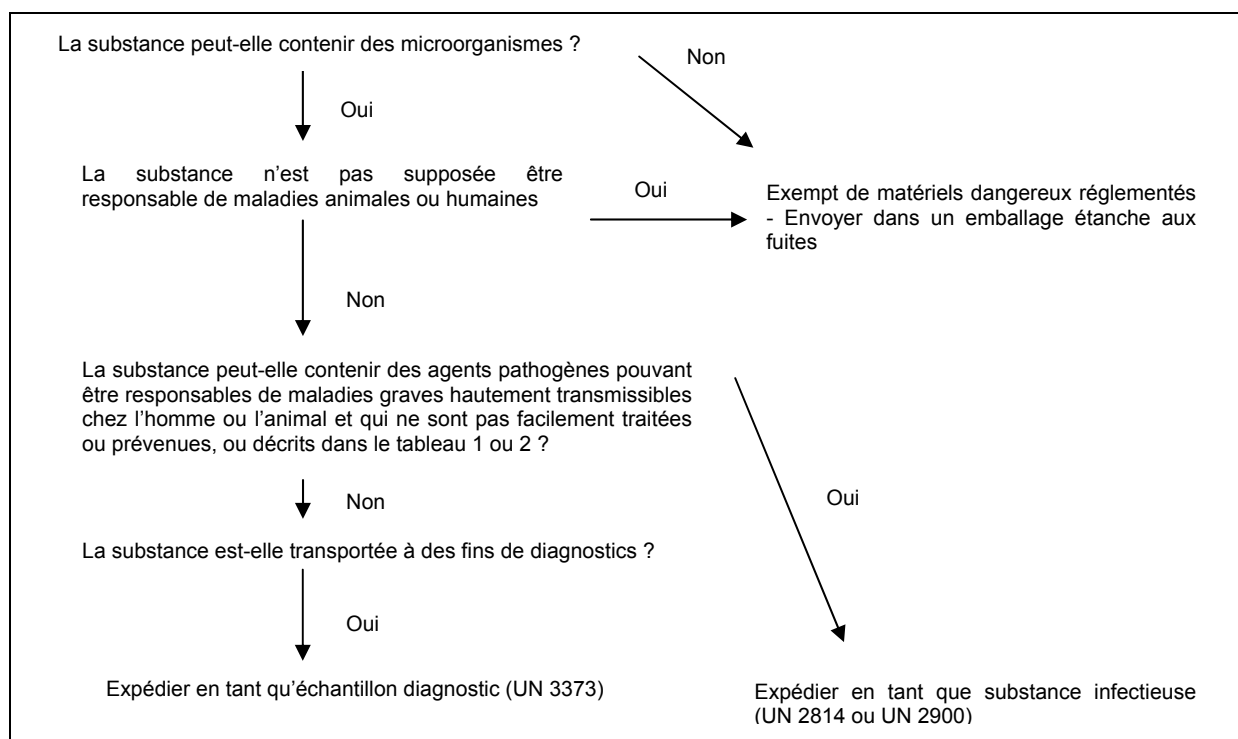
La définition de l'IATA pour l'amplification en culture est la suivante :

« Les cultures sont le résultat d'un procédé par lequel les agents pathogènes sont intentionnellement amplifiés ou propagés. Cette définition n'inclut pas les prélèvements de patients humains ou animaux. »

« Les prélèvements de patients sont des matériels humains ou animaux, collectés directement sur des humains ou animaux, incluant, mais non limités aux : excréments, sécrétions, sang et ses constituants, les tissus et les écouvillonnages de fluides tissulaires, et les parties de l'organisme étant transportées à des fins de recherche, de diagnostic, d'activités d'investigation, de traitement de maladie et de prévention. »

Note : Les cultures d'organismes qui ne correspondent pas à la définition de substance infectieuse de Catégorie A peuvent être transportées comme Substances Biologiques, Catégorie B.

Le diagramme suivant résume la classification des *ÉCHANTILLONS DE DIAGNOSTIC* ou *ÉCHANTILLONS CLINIQUES* ou *SUBSTANCES BIOLOGIQUES DE CATÉGORIE B*.



Les animaux vivants ne doivent pas être utilisés pour transporter des substances infectieuses.

Les carcasses d'animaux présentant des agents pathogènes de la Catégorie A ou qui seraient assignés à la Catégorie A en culture seulement, doivent être assignés à UN 2814 ou UN 2900 selon le groupement qui est le plus approprié. Les autres carcasses d'animaux présentant des agents pathogènes inclus dans la catégorie B doivent être transportées en respectant les recommandations énoncées par l'Autorité Compétente.

L'emballage des substances infectieuses et des échantillons issus d'animaux suspectés d'une maladie sérieuse, UN 2814 ou UN 2900, est décrit dans l'instruction d'emballage 620 ; une Déclaration d'Expédition de Produits Dangereux doit être remplie et soumise avec ces échantillons. Il est également exigé que l'expéditeur reçoive une instruction sur les procédures d'envoi approuvée par l'IATA pour les expéditions d'UN 2814 et UN 2900. En raison de la complexité de ces instructions, l'expéditeur devra se référer à la réglementation de l'IATA pour plus d'informations concernant les envois UN 2814 ou 2900 (7, 13).

L'autre groupe, l'UN 3373, concerne les « Échantillons de diagnostic ou les Échantillons cliniques ou les Substances biologiques de catégories B ». Cette catégorie présente un risque plus faible et les emballages contenant ces échantillons doivent être étiquetés comme « Échantillons de diagnostic ou les Échantillons cliniques ou les Substances biologiques de catégories B » ; une Déclaration de produits dangereux n'est pas nécessaire. L'instruction d'emballage 650 de l'IATA donne les instructions pour l'emballage de substances infectieuses assignées à UN 3373 et ce qui suit est un résumé de ces instructions d'emballage. Cependant, la

procédure complète, telle qu'elle est décrite dans la plus récente version de la Réglementation sur les produits dangereux de l'IATA, doit être suivie (7, 13).

- i) Les substances infectieuses assignées à UN 3373 « Échantillons de diagnostic » doivent être emballées dans un emballage de bonne qualité, qui doit être suffisamment solide pour résister aux chocs et aux chargements habituellement subis au cours des transports. L'emballage doit être construit et fermé afin d'empêcher toutes pertes du contenu, qui peuvent survenir dans des conditions normales de transport.
- ii) L'emballage doit être constitué de 3 éléments :
 - d'un réceptacle (conditionnement primaire) ;
 - d'un emballage secondaire ; et
 - d'un emballage externe rigide.
- iii) Pour les substances liquides :
 - Le réceptacle doit être étanche aux fuites et ne doit pas contenir plus de 1 litre ; l'emballage secondaire doit également être étanche aux fuites ;
 - Le premier réceptacle doit être entouré d'un matériel absorbant approprié afin d'absorber tout fluide ;
 - Si plusieurs premiers réceptacles sont utilisés, ils doivent être emballés individuellement ou séparés pour éviter le contact ;
 - Le premier réceptacle ou le second emballage doivent résister, sans fuite, à un différentiel de pression interne de 95 kPa dans une échelle de -40 °C à +55 °C (-40 °F à 130 °F) ;
 - L'emballage extérieur ne doit pas contenir plus de 4 litres. Cette quantité exclue la glace, la glace carbonique ou l'azote liquide utilisés pour maintenir les échantillons froids.
- iv) Pour les substances solides :
 - Le(s) premier(s) réceptacle(s) utilisé(s) pour des solides ne doit pas fuir (pas de perte de poudres) et ne doit pas excéder la limite de poids de l'emballage extérieur ; l'emballage secondaire doit être étanche aux fuites de poudres ;
 - Le premier réceptacle doit être entouré d'un matériel absorbant approprié afin d'absorber tout fluide dans ce premier réceptacle ;
 - Excepté pour les emballages contenant des parties de corps, d'organes ou des corps entiers, l'emballage externe ne doit pas contenir plus de 4 kg. Cette quantité exclue la glace, la glace carbonique, ou l'azote liquide utilisées pour maintenir les échantillons froids ;
 - S'il y a un doute concernant la présence ou non d'un liquide résiduel dans le réceptacle primaire pendant le transport alors un emballage adapté aux fluides, incluant le matériel absorbant, doit être utilisé.
- v) Une liste détaillée du contenu doit être jointe entre l'emballage second et l'emballage externe.
- vi) Si l'expédition se fait à température ambiante ou plus, le premier réceptacle doit avoir des explications claires assurant qu'il résiste aux fuites, telles qu'un bouchon résistant aux fuites, soudé par la chaleur ou un bouchon à jupe. Si des bouchons à vis sont utilisés, ils doivent être soudés avec un parafilm ou un adhésif.
- vii) Des blocs pré-congelés ou de la glace carbonique peuvent être déposés autour du second emballage. Si de la glace carbonique est utilisée, il doit y avoir un support interne pour maintenir le second emballage dans sa position originale après que la glace carbonique se soit dissipée. L'emballage externe doit permettre la libération du dioxyde de carbone. Il y a des recommandations particulières décrites dans la DGR en ce qui concerne l'utilisation d'azote liquide.
- viii) Les emballages contenant des échantillons de diagnostic ou cliniques ne nécessitent pas l'inscription de la quantité nette sur l'emballage extérieur. Cependant, si de la glace carbonique est utilisée comme réfrigérant, la quantité nette de glace carbonique doit être donnée.
- ix) Les réceptacles primaires et secondaires doivent être déposés dans un conteneur d'expédition avec un matériel de matelassage approprié.
- x) L'emballage doit pouvoir résister à une chute test de 1,2 m (Il existe des exigences supplémentaires concernant la résistance des emballages utilisés pour les échantillons UN 2900 et UN 2814).
- xi) La surface de l'emballage extérieur doit avoir au moins une dimension minimale de 100 mm × 100 mm.

- xii) Pour le transport, la marque 3373 doit être affichée sur la surface externe de l'emballage extérieur sur un fond de couleur contrastée et doit être clairement visible et lisible. La marque doit avoir la forme d'un carré disposé avec un angle de 45° (forme de diamant) et avec chaque côté d'une longueur d'au moins 50 mm, l'épaisseur de la ligne doit être d'au moins 2 mm, et les lettres et nombres doivent faire au moins 6 mm de haut. Le nom approprié d'envoi « Échantillon de Diagnostic », « Échantillon Clinique » ou « Substance Biologique de catégorie B » en lettre d'au moins 6 mm de haut doit être inscrit sur l'emballage extérieur à côté du symbole en forme de diamant.

4. Formulaires d'expédition

Tous les formulaires d'expédition, y compris la licence d'importation et le formulaire de soumission doivent être déposés dans une enveloppe attachée à l'extérieur du conteneur d'expédition. Les formulaires et les étiquettes doivent être remplis comme cela est décrit dans la DGR et également placés à l'extérieur du paquet.

E. CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS POUR UN STOCKAGE PROLONGÉ

Établir une collection d'échantillons pour une étude ultérieure peut s'avérer utile. Ceci peut inclure des cultures (pour la comparaison avec de futurs isolats), des tissus ou des échantillons de sérum qui peuvent être utilisés pour la validation de nouvelles méthodes et une collection de tissus fixés, ou de blocs de paraffine, pour de futures analyses histologiques. La plus utile des collections est sans doute la conservation d'échantillons de sérum. Ces échantillons stockés peuvent être utiles si une recherche rétrospective est faite pour comparer l'état d'une maladie actuelle avec celui des cas précédents.

• Banque de sérums

Les échantillons de sérums peuvent donner beaucoup d'informations à propos des animaux sur lesquels ils ont été prélevés. Les échantillons peuvent être testés pour une variété de constituants tels que les immunoglobulines, des traces d'éléments, de toxines, d'hormones et d'enzymes. Si une quantité suffisante d'échantillons de sérum a été prélevée au hasard sur une population, des comparaisons valides peuvent être faites en fonction du sexe, de l'âge, de la race et de la situation géographique. Les résultats de cette comparaison peuvent permettre l'identification de groupes à haut risque, des priorités dans les vaccinations peuvent être établies, et des profils et fréquences de maladies peuvent être déterminés (8).

Une banque de sérum est une collection référencée de sérums qui est stockée de telle sorte que les propriétés immunologiques et biochimiques sont conservées. Les conditions de stockage et la manière de référencer sont essentielles pour la réussite d'une banque sérologique. Chaque sérum doit être individuellement documenté et identifié. La base de données doit contenir toutes les informations utiles sur l'origine de l'échantillon et les résultats obtenus lors des tests. Des données supplémentaires pouvant être intéressantes, telles que les conditions climatiques et la productivité des animaux peuvent être incluses. Des dossiers précis sont essentiels et ils doivent être obtenus lorsque les échantillons de sang sont collectés. Le premier point essentiel est l'identification complète de l'animal. Le nombre de renseignements enregistrés doit être approprié à la capacité de l'opérateur, la précision étant plus importante que la quantité d'informations. Bien que le regroupement de sérum diminue la documentation et l'espace de stockage, il doit si possible être évité, parce qu'il réduit considérablement l'utilité du matériel. Une attention doit être portée pour que le sang soit prélevé de façon aussi aseptique que possible, et la stérilité doit être maintenue pendant la préparation du sérum et toutes autres manipulations. Les références de la banque de sérums doivent être bien organisées, et il est préférable de les conserver dans une base de données informatique avec une sauvegarde appropriée. Une méthodologie a été suggérée et est décrite en détail dans la référence 8.

Les sérums peuvent être stockés pour utilisation ultérieure pendant une certaine période de temps, ou peuvent être gardés pour un stockage à long terme à des fins historiques. Ces deux types de fonctions doivent être séparés. Les conditions de stockage doivent minimiser la perte des propriétés immunologiques et biochimiques du sérum. Il existe trois méthodes : la congélation, le stockage à sec sur des disques de papier à température ambiante et la lyophilisation. Pour une conservation à long terme de sérum par le froid, la température centrale doit être maintenue en dessous de -60 °C. La température la plus basse est la meilleure, mais c'est aussi la plus coûteuse. L'azote (N₂) en phase liquide est à -196 °C, la vapeur d'azote est à -100 °C et un congélateur ultra-froid maintient une température de -90 °C. Quelques banques de sérum ont été maintenues à -20 °C, mais les sérums peuvent se détériorer et ne plus permettre la détection de quelques paramètres, particulièrement s'ils ont été conservés longtemps à cette température. Les congélateurs ultra-froids doivent être équipés d'un système d'alerte si la température remonte en raison d'un problème mécanique ou d'une coupure électrique. Un générateur de secours est essentiel, ainsi qu'un espace froid de stockage alternatif si le transfert du contenu du congélateur s'avère nécessaire. Le stockage sur disque de papier est une méthode simple et peu coûteuse, mais elle ne permet le stockage que de petites quantités de sérum et le sérum élué n'est utilisable que pour un nombre

limité d'épreuves. Les disques doivent être gardés dans une atmosphère froide et sèche. Ils peuvent probablement donner des résultats satisfaisants jusqu'à 5 ans. La lyophilisation est généralement considérée comme la meilleure méthode de conservation à long terme des sérums. Si les conditions de congélation sont optimisées la perte des caractéristiques du sérum est minimisée. La lyophilisation nécessite un équipement coûteux et demande également beaucoup de temps. Les flacons de lyophilisat doivent être conservés à 4 °C.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANON (1993). Removal of blood from laboratory mammals and birds. First Report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW/Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals*, **27**, 1–22.
2. CAMERON A.R. & BALDOCK F.C. (1998). A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. *Prev. Vet. Med.*, **34**, 1–17.
3. CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY, LABORATORY DIRECTORATE: ANIMAL HEALTH (2002). Manual of Common Procedures. Section: Specimen Collection and Submission; Specimen Packaging; Specimen Transportation. Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Canada, 61 pp (<http://www.inspection.gc.ca/english/animal/heasan/disemala/cpm-mpc/indexe.shtml>).
4. CANNON R.M. & ROE R.T. (1982). Livestock Disease Surveys – A Field Manual for Veterinarians. Department of Primary Industry, Water and Environment, Australia, 15 pp.
5. COOK R., BARTON M., GLEESON L. & MAIN C. (1996). AUSVETPLAN Management Manual: Laboratory Preparedness. Animal Health Australia, Canberra, 56 pp. <http://www.aahc.com.au/ausvetplan/index.htm>.
6. HEM A., SMITH A.J. & SOLBERG P. (1998). Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Laboratory animals*, **32** (4), 364–368.
7. INTERNATIONAL AIR TRANSPORT ASSOCIATION (2006). Dangerous Goods Regulations, 44th Edition. International Air Transport Association, 800 Place Victoria, P.O. Box 113, Montreal, Quebec H4Z 1M1, Canada, 824 pp.
8. MOORHOUSE P.D. & HUGH-JONES M.E. (1981). Serum banks. *Vet. Bull.*, **51**, 277–290.
9. NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES (2006). Procedures for Collection and Submission of Specimens. National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA. <http://www.aphis.usda.gov/vs/nvsl/html/shipping.html>
10. STRAFUSS A.C. (1988). Necropsy: Procedures and Basic Diagnostic Methods for Practicing Veterinarians. Charles C. Thomas, Springfield, IL, USA, 244 pp.
11. VETERINARY LABORATORIES AGENCY (2003). Submission of Samples to the Veterinary Laboratories Agency. Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addlestone, Surrey, United Kingdom, 27 pp. www.vla.gov.uk/servtovet/documents/Submissions.pdf
12. VETERINARY SERVICES (OF THE UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE) (2005). Regulations for Classifying Infectious Substances and Diagnostic Specimens, USDA Veterinary Services Notice NO. 06-02
13. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2005). Guidance on regulations for the transport of infectious substances. http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2005_22/en/
14. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2006). Terrestrial Animal Health Code. OIE, Paris, France, www.oie.int.

*
* *

BIOSÉCURITÉ ET BIOSÛRETÉ AU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE VÉTÉRINAIRE ET DANS LES ANIMALERIES

INTRODUCTION

Le travail de laboratoire décrit dans ce Manuel terrestre doit être réalisé en appliquant des règles de sécurité maximales pour protéger le(s) travailleur(s) (biosécurité) et l'environnement (bio-confinement). La biosécurité implique l'évaluation du risque généré par une procédure particulière, suivie par les mesures appropriées pour minimiser les risques de contamination humaine et de diffusion possible dans le milieu extérieur. Le sujet est complexe et seules des considérations générales pourront être abordées dans ce chapitre introductif. Ce chapitre considère uniquement les risques générés à partir d'agents infectieux, mais les risques chimiques et physiques devront être également prévenus dans les laboratoires de microbiologie. Les risques de contamination sont réduits par les bonnes pratiques de laboratoire et des équipements sûrs permettant d'assurer un confinement des agents pathogènes. Il est important de comprendre que le confinement des agents pathogènes peut être utilisé pour atteindre un double objectif. L'un consiste à éviter la transmission d'une maladie à l'homme au laboratoire, l'autre à prévenir la diffusion d'agents pathogènes dans le milieu extérieur pouvant entraîner des maladies chez les animaux ou les humains. Souvent les mêmes stratégies de confinement peuvent être utilisées pour empêcher les infections contractées au laboratoire et pour éviter toute diffusion d'agents pathogènes qui pourrait provoquer des épizooties. Bien que les méthodes, les techniques, les équipements puissent être identiques, la liste des agents pathogènes et leur classement dans une catégorie de risque différeront selon que l'objectif prioritaire est le contrôle des maladies humaines ou animales.

Les Laboratoires de référence nationaux ou internationaux ont une expérience importante dans les règles de biosécurité adaptées aux agents pathogènes étudiés et aux dispositions et équipements nécessaires pour manipuler ces agents pathogènes. Quand de nouveaux laboratoires sont créés, il est conseillé de demander l'avis des autorités réglementaires concernées, des autorités compétentes de manière générale ainsi que des instituts déjà établies. Il est fondamental de se plier aux exigences réglementaires locales.

A. ÉVALUATION DES RISQUES LIÉS AUX PATHOGÈNES

Il est nécessaire d'évaluer dans un premier temps le risque généré par l'agent pathogène de façon à le classer dans un Groupe de risque. Une évaluation du risque supplémentaire sera réalisée, basée sur le travail précédent, pour estimer le niveau de confinement approprié. Pour évaluer le risque généré par un agent pathogène particulier vis-à-vis des humains et des animaux, il est nécessaire de savoir si la contamination par cet agent pathogène peut provoquer une maladie et être mortelle pour les humains ou les animaux, ou si une épidémie ou une épizootie peut être générée dans la population humaine ou animale lors de la diffusion de l'agent pathogène. Il faut tenir compte d'éléments supplémentaires liés au confinement des agents pathogènes animaux et à la prévention de leur diffusion pouvant générer une maladie dans la population animale. Pour évaluer ces risques, il est nécessaire de connaître l'épidémiologie du micro-organisme et d'autres caractéristiques comme son pouvoir infectieux pour les humains et les animaux, sa stabilité dans l'environnement, sa capacité à infecter par différentes voies et sa sensibilité à des traitements ou prophylaxies spécifiques (1, 2, 5, 6). Il est relativement facile d'obtenir de telles informations quand on travaille avec un agent pathogène connu, mais le problème devient plus complexe pour les laboratoires de diagnostic qui reçoivent du matériel clinique pouvant être infecté par différents agents pathogènes non identifiés, certains étant très dangereux pour la santé humaine ou constituant une menace sérieuse pour les populations animales. Les considérations générales à prendre en compte quand on évalue un risque sont :

1. l'incidence de l'infection humaine ou animale par le micro-organisme étudié ou les micro-organismes apparentés ayant des caractéristiques semblables, l'historique des infections contractées au laboratoire, la dose infectieuse et la gravité de la maladie, la production de toxines ou d'allergènes ;
2. le volume de culture devant être manipulé et la concentration du micro-organisme pouvant être présente (procédures comme la production d'antigène ou de vaccins qui requièrent de grandes quantités de micro-organismes, générant habituellement un risque élevé pouvant saturer les procédures de confinement) ;
3. l'origine de l'échantillon : par exemple des échantillons provenant d'espèces sauvages peuvent contenir des agents pathogènes humains ou animaux habituellement non présents ;
4. l'historique de l'isolat devant être manipulé. Le risque est souvent plus élevé lors de l'isolement primaire d'agents pathogènes ou après un faible nombre de passages par rapport à des agents pathogènes ayant subi de multiples passages. Dans certains cas, le pouvoir pathogène peut être exacerbé lors du passage en culture cellulaire ou lors d'une sous-culture en utilisant différents milieux ;
5. la possibilité de formation d'aérosols doit être prise en considération lors de la manipulation d'échantillons liquides ou par exemple lors du broyage, de l'homogénéisation et de la centrifugation ;
6. le risque que le micro-organisme peut générer pour les animaux de rente ou les animaux de compagnie ou la faune sauvage, indépendamment du risque pour le personnel du laboratoire. Des précautions supplémentaires de manipulation et de stockage sont nécessaires pour les agents de maladies animales provenant de pays étrangers ;
7. l'état de santé des travailleurs. Par exemple, des précautions particulières peuvent être nécessaires dans le cas d'une femme enceinte ou d'une personne immunodéficiente ou allergique. Parfois, certains individus doivent être retirés de postes de travail particuliers qui pourraient être spécialement dangereux pour eux ;
8. un niveau élevé de risque peut survenir lorsque des agents pathogènes comme *Brucella* ou *Mycobacterium* sont inoculés à des animaux. Pour évaluer l'impact d'une inoculation à l'animal, une évaluation du risque doit être effectuée et les facteurs suivants doivent être pris en considération :
 - a) espèce hôte *versus* espèce inoculée,
 - b) souche/traitement et concentration de l'inoculum,
 - c) voie d'inoculation,
 - d) hébergement des animaux,
 - e) types de prélèvement au cours de l'expérimentation.
9. Certains agents pathogènes ont besoin pour leur transmission de vecteurs spécifiques ou ont besoin d'hôtes intermédiaires pour terminer leur cycle évolutif avant de pouvoir infecter des animaux et causer des maladies. Dans les pays où de tels vecteurs ou hôtes intermédiaires n'existent pas, ou dans lesquels les facteurs climatiques ou environnementaux ne favorisent pas leur survie, ces agents pathogènes représentent un risque plus faible pour la santé animale que dans les pays où ces vecteurs ou hôtes intermédiaires sont naturellement présents ou pourraient survivre.

B. CLASSIFICATION DES MICRO-ORGANISMES BASÉE SUR LES RISQUES POUR LA SANTÉ HUMAINE OU ANIMALE

Les considérations précédentes ont été prises en compte par plusieurs autorités nationales pour classer les micro-organismes dans 4 Groupes de risque (2, 4), représentant un risque graduel pour la santé humaine. Une telle classification des agents pathogènes ne prend pas en considération les personnes qui sont particulièrement sensibles, comme par exemple les personnes malades, les immunodéficients ou les femmes enceintes. Les 4 Groupes peuvent être résumés ainsi :

Groupe 1 – Micro-organismes ayant peu de risque de provoquer une maladie humaine ou animale ou qui causent des maladies enzootiques mais non soumises à un contrôle officiel.

Groupe 2 – Micro-organismes pouvant provoquer une maladie humaine ou animale, mais ne diffusant pas ou peu dans les populations et pour laquelle une prophylaxie et un traitement efficaces sont disponibles ; exemples d'agents pathogènes animaux du Groupe 2 :

- i) Micro-organismes ne dépendant pas de vecteurs ou d'hôtes intermédiaires pour leur transmission ;
- ii) La transmission entre différentes espèces animales est limitée ou absente ;
- iii) En cas de sortie du laboratoire, la diffusion géographique est limitée ;
- iv) La transmission directe d'animal à animal est limitée ;
- v) La transmission est réalisée essentiellement par ingestion, inoculation ou à travers les muqueuses ;
- vi) La nécessité d'isoler les animaux malades ou infectés n'est pas absolue ;
- vii) La gravité clinique ou l'impact économique de la maladie sont limités ;
- viii) Les micro-organismes ne peuvent pas survivre longtemps dans le milieu extérieur et un traitement ou une prophylaxie efficaces sont disponibles ;
- ix) Les micro-organismes peuvent être enzootiques ou exotiques, mais ils font l'objet d'un contrôle officiel et ne présentent qu'un risque faible de diffusion hors du laboratoire.

Groupe 3 – Micro-organismes causant des maladies humaines ou animales graves et pouvant diffuser dans les populations, mais pour lesquelles il existe habituellement une prophylaxie et un traitement efficaces ; exemples d'agents pathogènes animaux du Groupe 3 :

- i) Les micro-organismes dépendent de vecteurs ou d'hôtes intermédiaires pour leur transmission ;
- ii) La transmission entre différentes espèces animales est possible ;
- iii) En cas de sortie du laboratoire, la diffusion géographique est modérée ;
- iv) La transmission directe d'animal à animal peut facilement survenir ;
- v) L'isolement réglementaire des animaux malades, infectés ou ayant été en contact est indispensable ;
- vi) La gravité ou l'impact économique de la maladie ne sont pas négligeables ;
- vii) Des traitements ou des mesures de prophylaxie ne sont pas facilement disponibles ou, quand ils existent, n'offrent qu'un bénéfice limité ;
- viii) La transmission peut se réaliser par voie aérienne ou par contact direct ;
- ix) Les micro-organismes peuvent être enzootiques ou exotiques, mais ils font l'objet d'un contrôle officiel et ne présentent qu'un risque modéré de diffusion hors du laboratoire.

Groupe 4 – Micro-organismes causant des maladies humaines ou animales gravissimes avec un fort risque de diffusion dans les populations et pour lesquelles il n'existe pas de prophylaxie ou de traitement efficace.

- i) Les micro-organismes peuvent dépendre de vecteurs ou d'hôtes intermédiaires pour leur transmission ;
- ii) La transmission entre différentes espèces animales peut aisément se réaliser ;
- iii) En cas de sortie du laboratoire, le micro-organisme peut avoir une large diffusion géographique ;
- iv) La transmission directe d'animal à animal est très facile ;
- v) Les micro-organismes peuvent être transmis par contact direct de courte durée ou indirectement ;
- vi) L'isolement réglementaire des animaux malades, infectés ou ayant été en contact est obligatoire ;
- vii) Un contrôle réglementaire des mouvements des animaux sur de grandes distances est nécessaire ;
- viii) La gravité clinique de la maladie ou son impact économique sont extrêmement sévères ;
- ix) Aucun traitement n'est disponible, non plus que des mesures de prophylaxie satisfaisantes ;
- x) Le risque de sortie du laboratoire et de diffusion dans le milieu extérieur et la population animale du pays est très élevé.

Les agents infectieux qui peuvent être rencontrés au laboratoire ont été regroupés en 4 Groupes de risque allant de 1 à 4 par les autorités de nombreux pays (2, 4). Quelques exemples d'agents pathogènes dangereux pouvant être rencontrés dans un laboratoire vétérinaire et entraîner des maladies chez les humains, sont listés dans le

tableau 1. Quelques agents pathogènes graves de niveau 4, comme les virus Hendra ou Nipah, ont été isolés à partir de prélèvements dans des laboratoires vétérinaires.

Tableau 1. Exemples de micro-organismes des Groupes de risque 2 et 3 et pouvant provoquer une maladie humaine et être présents dans un laboratoire vétérinaire.

Groupe 2
Virus : virus Influenza types A, B, C et autres virus d'influenza aviaire ne nécessitant pas de notification ; virus de la maladie de Newcastle ; virus de l'ecthyma contagieux du mouton (virus parapox).
Bactéries : <i>Alcaligenes</i> spp. ; <i>Arizona</i> spp. ; <i>Campylobacter</i> spp. ; <i>Chlamydia psittaci</i> (non aviaire) ; <i>Clostridium tetani</i> ; <i>Clostridium botulinum</i> ; <i>Corynebacterium</i> spp. ; <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Haemophilus</i> spp. ; <i>Leptospira</i> spp. ; <i>Listeria monocytogenes</i> ; <i>Moraxella</i> spp. ; <i>Mycobacterium avium</i> ; <i>Pasteurella</i> spp. ; <i>Proteus</i> spp. ; <i>Pseudomonas</i> spp. ; <i>Salmonella</i> spp. ; <i>Staphylococcus</i> spp. ; <i>Yersinia enterocolitica</i> ; <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .
Champignons : <i>Aspergillus fumigatus</i> ; <i>Microsporum</i> spp. ; <i>Trichophyton</i> spp.
Groupe 3
Virus : virus de la rage ; virus de l'encéphalomyélite équine (Est, Ouest et Vénézuélienne) ; virus de l'encéphalomyélite B japonaise ; virus de l'encéphalomyélite écossaise à flavivirus.
Bactéries : <i>Bacillus anthracis</i> ; <i>Burkholderia mallei</i> (<i>Pseudomonas mallei</i>) ; <i>Brucella</i> spp. ; <i>Chlamydia psittaci</i> (souches aviaires seulement) ; <i>Coxiella burnetti</i> ; <i>Mycobacterium bovis</i> .

C. EXIGENCES POUR LE TRAVAIL AVEC DES AGENTS INFECTIEUX

1. Agents pathogènes connus

La classe de risque de l'agent pathogène étudié ayant été déterminée, il est ensuite possible de définir le niveau de confinement approprié pour réduire au maximum le risque de maladie humaine ou celui de diffusion de la maladie aux animaux et dans le milieu extérieur. Le niveau de confinement est défini par les équipements et les méthodes de travail mises en œuvre. Les organismes classés dans les quatre Groupes de risque comme précédemment définis, doivent être placés dans un niveau de confinement approprié à des conditions de travail sûres (voir ci-dessous). Les laboratoires utilisent en général un agent de sécurité biologique, responsable d'assurer la manipulation des microorganismes selon le niveau de confinement approprié. L'agent de sécurité doit avoir une formation suffisante et une autorité certaine pour superviser et contrôler tous les points relatifs à la sécurité. Dans les grands instituts comprenant un réseau de laboratoires, il convient de nommer un agent principal de sécurité chargé de superviser et de coordonner les points liés à la sécurité, qui sont exécutés par des agents de sécurité locaux au niveau de chaque site. Les méthodes de travail pour une procédure particulière ou un poste de travail doivent être écrites et facilement accessibles. L'équipe doit être entraînée et complètement informée des risques potentiels pour la santé humaine générés par leur travail et des procédures doivent être mise en place pour noter les incidents ou accidents. Un dossier médical doit être établi pour chaque membre du personnel de laboratoire mentionnant les agents pathogènes auxquels il est susceptible d'être exposé. Dans certains cas, il sera nécessaire de vacciner le personnel vis-à-vis de l'agent manipulé afin d'apporter une protection supplémentaire (par exemple vaccination contre la rage pour le personnel manipulant le virus rabique). Cet acte devra être mentionné dans le dossier médical. De telles informations sont utiles pour le médecin lors d'apparition d'une maladie. Un suivi médical régulier des employés est recommandé, de même que la réalisation de tests appropriés pour le suivi des personnes au contact d'agents pathogènes majeurs comme les agents de la brucellose et de la tuberculose.

De nombreuses informations concernant le confinement des agents pathogènes sont disponibles. Des appareillages sophistiqués et des bâtiments adaptés peuvent être construits pour le confinement des organismes les plus dangereux en suivant les normes, guide de référence et réglementations du pays. Les exigences dépendent du confinement nécessaire, du plus basique au niveau le plus élevé.

Exigences essentielles pour tous les types de travail au laboratoire. Les exigences essentielles pour un travail au contact d'un agent infectieux, quoiqu'apparemment inoffensif, sont décrites ci-dessous :

1. le laboratoire doit être facile à nettoyer, avec des surfaces imperméables et résistantes aux produits chimiques. Chaque laboratoire doit disposer d'un lave-mains, d'une douche d'urgence, incluant un bain oculaire comme c'est le cas pour les produits chimiques et autres risques de laboratoire. Des procédures

- doivent être établies pour un nettoyage fréquent et une désinfection pendant et à la fin d'une période de travail ;
2. les accès au laboratoire doivent être restreints au seul personnel ; des mesures de sécurité appropriées telles que l'accès électroniquement contrôlé peuvent se révéler nécessaires pour les agents pathogènes à haut risque ;
 3. des vêtements de protection individuels comme les blouses de laboratoire à manches longues, des chaussures fermées, des gants à usage unique, des masques, des lunettes de protection et des respirateurs oro-nasaux appropriés doivent être portés au laboratoire et quittés à la sortie du laboratoire ;
 4. la porte du laboratoire doit être fermée quand le travail est en cours de réalisation et une ventilation doit permettre une extraction de l'air à partir de la pièce (quand des enceintes de biosécurité sont utilisées, l'équilibre des flux doit être parfaitement ajusté) ;
 5. nourriture (y compris chewing-gum, bonbons, pastilles pour la gorge, etc.) ou boisson ne doivent pas être conservées ou consommées dans les laboratoires ;
 6. il est interdit de fumer et de se maquiller dans un laboratoire ;
 7. il est interdit de pipetter avec la bouche ;
 8. il faut toujours minimiser les aérosols ;
 9. des programmes de réponse urgente doivent être développés pour traiter les risques biologiques. Certains des articles mentionnés dans le programme doivent inclure la mise à disposition d'un désinfectant efficace pour nettoyer les coulures, enlever et décontaminer les vêtements de protection contaminés, laver les mains, et nettoyer et désinfecter les plans de travail ;
 10. la verrerie de laboratoire et tout autre matériel contaminé doivent être stockés sans générer de risques avant leur désinfection. Le matériel devant être éliminé doit être transporté, sans être renversé, dans des récipients à paroi renforcée. Les déchets doivent être autoclavés, incinérés ou traités par toute autre méthode homologuée avant leur élimination. Le matériel réutilisable doit être décontaminé par une méthode appropriée ;
 11. Aucun matériel infectieux ne doit être éliminé dans les éviers du laboratoire ou tout autre système d'évacuation des eaux usées ;
 12. Tout accident ou incident doit être consigné et enregistré sur le livre de l'Agent de Sécurité.

Niveau de confinement pour les pathogènes du Groupe 2, en plus de ce qui a été décrit précédemment, une hotte de sécurité microbiologique de catégorie I, II ou III, doit être utilisée quand des aérosols sont générés ou lorsque de grands volumes de culture sont manipulés ou lorsqu'il y a un besoin réel de protéger le produit biologique (se reporter à la section D). Des affiches appropriées sont nécessaires sur toutes les portes d'entrée pour indiquer la présence de risque et le nom et le numéro de téléphone de la ou des personne(s) responsable(s). Les consignes de sécurité en cas d'urgence sont affichées dans le laboratoire pour avertir le personnel de la marche à suivre lors de dispersion de l'agent pathogène ou lors de la nécessité d'évacuer le laboratoire en cas d'incendie ou d'une autre urgence.

Niveau de confinement pour les pathogènes du Groupe 3, il est conseillé d'installer le laboratoire dans un site isolé et de restreindre l'entrée à des personnes correctement formées pour le niveau 3. Les consignes de sécurité en cas d'urgence sont affichées dans le laboratoire pour avertir le personnel de la marche à suivre lors de dispersion de l'agent pathogène ou lors de la nécessité d'évacuer le laboratoire en cas d'incendie. Le niveau de confinement de l'OIE pour les agents pathogènes du Groupe 3 surpasse les directives du niveau 3 de biosécurité (BSL-3) du Département de Santé et des Services Humains des États-Unis (DHHS) (16) et du Département de l'Agriculture des États-Unis (USDA) (15).

De plus le laboratoire doit être en pression négative et les différentiels de pression doivent être contrôlés ; une procédure doit être développée pour qu'il y ait une alarme en cas de problème et le personnel compétent pour y répondre doit être présent. Un système de ventilation impose un flux d'air du laboratoire vers l'extérieur après un passage sur des filtres absolus du type HEPA. Les filtres HEPA doivent être vérifiés régulièrement (habituellement 1 fois par an) ; en incluant les filtres HEPA des enceintes de biosécurité et les gaz d'échappement des pièces ou équipements. Le laboratoire doit pouvoir être fermé hermétiquement afin d'être stérilisé par fumigation et posséder un sas d'entrée. Il est nécessaire de traiter les effluents en fonction de l'agent pathogène. Des enceintes de biosécurité de Classe I, II ou III doivent être utilisées à chaque fois que le travail prévu risque de générer un aérosol (17). Il peut s'avérer nécessaire que le personnel doive se doucher en sortant du laboratoire, porter des vêtements réservés au laboratoire et laissés dans l'enceinte du laboratoire avant de quitter le bâtiment.

Note : en raison du lien entre l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et le nouveau variant humain de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, l'ESB et les agents liés sont maintenant classés avec les encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines dans le Groupe de Risque 3. Par conséquent, les vétérinaires et les

techniciens de laboratoire qui réalisent les autopsies sur les animaux suspectés d'ESB ou manipulant des tissus prélevés sur de tels animaux, doivent travailler dans des conditions strictes de confinement approprié, avec parfois des dérogations permises par la nature du travail et les résultats de l'évaluation du risque local. Il est important que des vêtements de protection appropriés soient portés et qu'un code strict de pratique soit suivi afin de prévenir une exposition à l'agent pathogène. Les laboratoires effectuant des travaux sur l'ESB doivent satisfaire la réglementation nationale de bioconfinement et de biosécurité (3).

Niveau de confinement pour les pathogènes du Groupe 4, les mesures de précaution les plus élevées doivent être prises en incluant des systèmes d'accès par des sas contrôlés avec gradient de pression. Le bâtiment est maintenu sous une pression négative. Les entrées d'air passent sur un seul filtre HEPA et l'air extrait sur une série de double filtre HEPA. Tout travail opéré avec du matériel infectieux doit être réalisé dans des enceintes de sécurité microbiologique de Classe III ou des enceintes de classe II conjointement avec l'utilisation de combinaisons de travail en pression positive. Toutes les eaux usées, les effluents du laboratoire et les effluents d'évacuation d'autoclave doivent être traités par des moyens appropriés pour s'assurer que tout le matériel infectieux soit détruit avant d'entrer dans le système d'évacuation des eaux usées hors du laboratoire. Le personnel doit se doucher et changer de vêtements avant de quitter le bâtiment. D'autres précautions décrites pour le niveau 3 devront également être appliquées. L'utilisation d'un bâtiment unique en pression positive est aujourd'hui une condition internationalement acceptée pour obtenir un niveau 4 de confinement.

Les directives de l'OIE pour le niveau de confinement des pathogènes du Groupe 4 sont, en général, égales à celles du niveau 3 de biosécurité (BSL-3) de l'USDA (15). La principale différence entre les directives du niveau 4 de l'OIE et du BSL-3 spécifie que le laboratoire doit être hermétique et doit passer un contrôle de pression dans le temps pour confirmer qu'il ne dépasse pas le taux de fuite maximal prescrit.

2. Diagnostic d'agents pathogènes

Les laboratoires de diagnostic vétérinaire reçoivent des prélèvements qui sont soumis à diverses analyses pour identifier l'agent pathogène. La nature infectieuse de l'échantillon est généralement inconnue, mais l'existence d'un agent infectieux pouvant contaminer l'homme ou les animaux est toujours possible. Des mesures pratiques et des procédures sont nécessaires pour minimiser le risque d'exposition des travailleurs à de tels pathogènes. À moins qu'un échantillon soit suspecté de contenir un pathogène nécessitant un niveau de confinement supérieur, il est admis que la manipulation d'échantillon biologique doit être réalisée au début de l'analyse dans un niveau de confinement du Groupe 2. Les mesures les plus importantes sont d'empêcher une contamination percutanée ou une exposition des muqueuses. Des enceintes de sécurité biologiques doivent être utilisées pour toutes les manipulations qui peuvent générer des aérosols. Des enceintes de classe I ou II sont appropriées et seront utilisées en fonction du degré de protection des échantillons vis-à-vis d'une contamination. Il n'y aura pas de pipetage à la bouche et des vêtements protecteurs devront être portés ; dans certains cas, les yeux et le système respiratoire pourront être protégés en fonction du niveau évalué de l'exposition. Bien que les procédures initiales de diagnostic puissent être effectuées à un niveau 2 de confinement, lorsqu'un agent pathogène des groupes 3 ou 4 a été isolé (ou suspecté), le travail doit être poursuivi dans un niveau de confinement plus élevé.

D. ENCEINTES DE SÉCURITÉ MICROBIOLOGIQUES

Elles sont utilisées à des niveaux de confinement différents, comme cela est décrit dans la section C. ci-dessus. Elles sont de trois types :

Classe I : enceinte ouverte frontalement et spécialement étudiée pour protéger l'opérateur et le milieu extérieur sans pour autant protéger l'échantillon ou le travail effectué.

Classe II : enceinte de sécurité ouverte frontalement, parfois décrite dans la catégorie : hotte à flux laminaire avec recirculation. Ces hottes sont étudiées pour apporter une protection au manipulateur, à l'échantillon et au milieu extérieur.

Classe III : ces enceintes sont fermées et portent une paire de gants sur leur face avant. C'est le plus fort degré de protection avec une séparation complète du travail et du travailleur. Certaines hottes ont des gants pouvant être retirés et sont des enceintes de classe III/I. Elles peuvent être utilisées dans l'un ou l'autre mode.

Des descriptions d'enceintes de sécurité et des principes de travail avec des règles de sécurité ont été publiées (8, 10, 17).

E. CONSERVATION DES AGENTS PATHOGÈNES

La conservation d'agents pathogènes vivants requiert un confinement et une sécurité appropriés pour éviter tout risque dû à la rupture ou à une utilisation non prévue du matériel. Les systèmes de stockage doivent être parfaitement identifiés pour indiquer la nature de l'agent pathogène (c'est à dire le Groupe) et la ou les personne(s) responsables (s) de ces agents pathogènes à contacter pour obtenir des informations. Un inventaire complet des agents pathogènes conservés doit être entretenu et maintenu disponible. Des précautions spéciales doivent être prises quand les flacons en verre d'agents pathogènes lyophilisés sont ouverts, car ils peuvent se briser. Des précautions doivent être également prises quand on travaille avec de l'azote liquide ou dans des locaux dans lesquels des gaz toxiques pourraient être produits.

Plusieurs considérations décrites ci-dessus ne concernent pas seulement les agents pathogènes humains, mais servent également à prévenir la diffusion d'agents pathogènes animaux. Dans un laboratoire vétérinaire, une responsabilité importante est de minimiser tout passage d'agents pathogènes animaux vers les animaux domestiques ou la faune sauvage. Des contacts étroits doivent être maintenus avec les autorités vétérinaires. Des directives nationales pour des licences spéciales pourront être nécessaires pour travailler avec certains micro-organismes.

F. RISQUES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

Le travail au laboratoire nécessite de nombreuses manipulations qui sont potentiellement dangereuses comme la manipulation de verrerie et l'utilisation d'aiguilles, ou d'autres instruments tranchants. Des procédures et des équipements appropriés doivent être disponibles pour l'élimination en toute sécurité des aiguilles et autres instruments tranchants usagés.

Le personnel du laboratoire doit être protégé des risques de brûlures liés à des liquides ou du matériel. Les autoclaves doivent être équipés de dispositifs de sécurité pour empêcher une ouverture accidentelle des portes lors de la mise sous pression et être régulièrement utilisés et contrôlés. Des gants, des masques couvrant toute la face et des tabliers protégeant de la chaleur doivent être utilisés. Le grand froid peut être également source de danger, comme la manipulation d'azote liquide ; des aspersions sur la peau peuvent provoquer des brûlures. Il faut porter des gants isolants, pour éviter la pénétration du froid, et étanches, pour éviter la pénétration de l'azote liquide. Des masques de protection de tout le visage et des bottes devront également être portés lors de travail avec l'azote liquide. L'évaporation de l'azote à partir des conteneurs d'azote liquide peut conduire, dans les locaux mal ventilés, à une raréfaction de l'oxygène avec des conséquences fatales.

L'irradiation est un risque grave qui peut exister lors de la manipulation de sources de rayons X ou lors de l'utilisation d'émetteur gamma ou d'autres sources. Le matériel doit être utilisé et contrôlé régulièrement. Tout usage de radioéléments doit être minutieusement enregistré. Tout le personnel doit porter un badge de surveillance individuelle vis-à-vis des radiations et doit subir des examens médicaux annuels. Les réglementations locales et nationales doivent être appliquées (10).

Une large gamme de produits chimiques est utilisée dans les laboratoires vétérinaires ; certains sont des toxiques ou des mutagènes, d'autres peuvent être cancérigènes. On doit toujours se souvenir que c'est la dose qui fait le poison. Les vapeurs de produits chimiques sont spécialement dangereuses, certaines substances chimiques pouvant être absorbées par pénétration de la peau intacte. La stérilisation par la vapeur peut rendre volatiles des produits chimiques toxiques et mettre ainsi en danger les personnels qui déchargent les autoclaves ou les autocuiseurs. Des procédures suffisantes de protection des femmes enceintes travaillant dans les laboratoires doivent être suivies à tout moment. Une liste de produits dangereux doit être maintenue à jour et la liste des produits chimiques manipulés par chaque membre de l'équipe doit être répertoriée. C'est maintenant une exigence réglementaire dans certains pays. Les produits chimiques doivent être correctement stockés dans des récipients appropriés et à une température adéquate. Les produits inflammables doivent être gardés dans des enceintes chimiques ignifugées. Un fichier des fournisseurs et des produits chimiques dangereux doit être établi : quantité, date, utilisation, utilisateur. L'élimination de certains produits chimiques est réglementée officiellement.

D'autres informations concernant les règles de sécurité en matière de produits chimiques et de risques physiques sont décrites dans la littérature (11, 12).

G. ANIMALERIES

Le travail avec des agents pathogènes dans des animaleries entraîne des risques spécifiques. Chaque pièce de l'animalerie doit être conçue en tenant compte des niveaux de confinements et des normes en vigueur comme pour les laboratoires. Le niveau de confinement de l'animalerie est très important compte tenu de la quantité d'agents infectieux qui peut être générée. Des considérations similaires sont à prendre en compte pour la formation du personnel, les vêtements de protection et les enregistrements des expérimentations. Des

précautions adaptées doivent être prises pour éviter toute blessure du personnel par morsure ou coup ainsi que tout accident par auto-inoculation. De tels accidents doivent être enregistrés et les blessures doivent être traitées de façon appropriée. La stérilisation des carcasses par autoclavage, leur incinération ou leur élimination doivent être prévues de même que le nettoyage intensif et la désinfection de toute pièce de l'animalerie. Les pièces de l'animalerie doivent être non seulement adaptées aux animaux hébergés, mais aussi être construites et ventilées afin d'assurer le confort des animaliers. Ceci est un vaste sujet qui ne peut être traité que brièvement dans cette section (4, 7). Un livre excellent concernant la santé et la sécurité dans les animaleries de laboratoire est disponible (18).

H. MESURES D'URGENCE

Un équipement de première urgence doit être disponible facilement, maintenu dans un emplacement propre n'étant pas contaminé par le travail effectué dans le laboratoire (par exemple, dans un sas ou un vestibule). Cet équipement doit être approprié au travail et correctement maintenu. Il doit être gardé sous la main en cas d'urgence et à la disposition des personnels formés aux premiers soins. Des compresses, bandes, et des produits pharmaceutiques doivent être maintenus à disposition. Certaines équipes doivent recevoir un entraînement, reconnu par les autorités, en matière de sécurité et de premier secours et doivent posséder un certificat valide comme preuve de leur compétence. Les personnels travaillant dans des laboratoires de niveau de confinement 4 doivent posséder des compétences avancées pour les premiers soins. Leurs noms et postes doivent être connus par chacun et affichés sur les tableaux d'affichage. L'ensemble du personnel doit être informé de l'importance des règles de sécurité. Des procédures et un équipement doivent être disponibles en cas de renversements et de décontamination. Un registre de tous les incidents doit être tenu à jour et, dans certains pays, obligation est faite de rapporter tous les incidents à l'autorité compétente.

Des procédures doivent être écrites concernant l'urgence lors de défaillances des systèmes de confinement ou du maintien de l'air, par exemple dans les enceintes de sécurité microbiologique ou les pièces de confinement biologique, qui peuvent conduire à une perte du niveau de confinement.

De nombreux laboratoires sont maintenant dotés d'un comité hygiène et sécurité pour améliorer les règles de sécurité et discuter des mesures à prendre avec le responsable. Le personnel est responsable de sa propre sécurité et de celle de leur entourage. Le directeur de laboratoire est aussi responsable de la sécurité pour l'ensemble de son laboratoire ; les considérations de temps et de coût ne doivent pas entrer en considération pour la mise en place des règles de sécurité au niveau du personnel ou de celles concernant le confinement des agents responsables de maladies animales.

Une procédure d'urgence doit exister pour obtenir, en cas de besoin, une assistance médicale, voire l'hospitalisation dans des services de maladies infectieuses. Des alarmes incendies doivent être prévues et testées régulièrement. L'institution ou le laboratoire doit désigner un responsable chargé de contrôler les situations d'urgence, d'assurer la communication et de diriger des exercices périodiques pour apprendre au personnel quoi faire et où se rassembler en cas d'urgence. Le responsable incendie doit s'assurer que tout le personnel a évacué le bâtiment et que chacun est à l'abri. Des procédures pour des catastrophes naturelles, comme les ouragans ou les tremblements de terre, doivent être mise en place lorsque ceux-ci présentent un risque. Toutes ces procédures doivent être écrites et revues périodiquement.

I. TRANSPORT DE MATÉRIEL INFECTIEUX

Un soin particulier doit être apporté à la préparation et l'emballage pour le transport d'échantillons pour le diagnostic, le matériel infectieux et les agents pathogènes afin de s'assurer que le récipient ne se casse pas et qu'il n'y ait pas de fuite du contenu qui pourrait engendrer un risque pour les agents des postes, les coursiers et les personnes travaillant à la réception du courriers au laboratoire. L'application des réglementations locales, nationales et internationales pour le transport de marchandises dangereuses (échantillons pour le diagnostic ou matériel infectieux) et l'importation de pathogènes d'animaux doivent être suivies. Elles sont résumées dans le Chapitre 1.1.1. « Prélèvement et expédition des échantillons pour le diagnostic ».

Lors du classement des agents pathogènes dans l'un des Groupes, il convient de tenir compte des critères suivants :

a) Agents pathogènes animaux du Groupe 1

Organismes causant des maladies enzootiques qui ne sont pas soumises à un contrôle officiel.

b) Agents pathogènes animaux du Groupe 2

Organismes causant des maladies soit exotiques soit enzootiques, mais qui sont soumises à un contrôle officiel et qui présentent un risque faible de diffusion à partir du laboratoire.

c) Agents pathogènes animaux du Groupe 3

Organismes causant des maladies soit exotiques soit enzootiques, mais qui sont soumises à un contrôle officiel et qui présentent un risque modéré de diffusion à partir du laboratoire.

d) Agents pathogènes animaux du Groupe 4

Organismes causant des maladies soit exotiques soit enzootiques mais qui sont soumises à un contrôle officiel et qui présentent un risque élevé de diffusion dans le milieu extérieur et la population animale du pays à partir du laboratoire.

J. GROUPES DE CONFINEMENT

1. L'objectif principal du confinement est de prévenir la sortie des agents pathogènes du laboratoire et leur diffusion dans la population animale du pays. Certains agents pathogènes animaux peuvent aussi affecter les humains. Dans ce cas, la menace pour la santé humaine peut demander un confinement plus grand que celui qui serait autrement considéré comme suffisant sur la seule base des considérations de santé animale. De même, il convient de prendre en compte et de contrôler le risque de transmission de l'homme vers l'animal. En outre, les animaux utilisés au laboratoire pour des expériences sur les agents pathogènes doivent être maintenus à un niveau de confinement approprié.
2. Le niveau du confinement physique et des procédures de biosécurité ne doit pas être inférieur à celui du Groupe dans lequel l'agent pathogène a été classé, et les exigences doivent être fonction de la nature de l'agent pathogène (c-à-d, bactéries, virus, champignons ou parasites). Le niveau de confinement minimum est requis pour les agents pathogènes du Groupe 1 et le niveau de confinement maximum pour ceux du Groupe 4. La section K présente un guide des exigences de confinement pour les Groupes 2, 3 et 4.
3. Certains arthropodes peuvent être soit directement pathogènes soit vecteurs pour des agents pathogènes. S'ils sont vecteurs pour un agent pathogène utilisé au laboratoire, il convient de confiner l'agent pathogène à un niveau de confinement approprié en plus d'un confinement de l'arthropode.

K. GUIDE SUR LES CONDITIONS REQUISES POUR LES DIFFÉRENTS GROUPES DE CONFINEMENT AU LABORATOIRE OU DANS LES ANIMALERIES

Conditions requises pour le laboratoire et les animaleries	Groupe de confinement		
	2	3	4
A) Structure et aménagement du laboratoire et des animaleries			
1. Installation du laboratoire et des animaleries dans des lieux isolés		Oui	Oui
2. Éloignement de toute source d'incendie	Oui	Oui	Oui
3. Zones distinctes pour le travail de laboratoire et les autres activités	Oui	Oui	Oui
4. Mesures de protection contre l'entrée ou la sortie des rongeurs et des insectes	Oui	Oui	Oui
5. Stérilisation et suivi des effluents liquides		Oui	Oui
6. Stérilisation et suivi des effluents liquides en provenance de stérilisateurs à vapeur			Oui
7. Isolement par des sas – Flux d'air continu à l'intérieur		Oui	Oui
8. Pression négative dans le laboratoire et les animaleries avec enregistrement du différentiel de pression		Oui	Oui
9. Filtration de l'air entrant au travers de filtres HEPA ou équivalents tels que des clapets étanches au gaz; filtration de l'air extrait sur un seul filtre HEPA pour les laboratoires et sur deux filtres HEPA pour les animaleries		Simple filtre pour l'extraction	Simple filtre pour l'entrée – double filtre pour l'extraction

Conditions requises pour le laboratoire et les animaleries	Groupe de confinement		
	2	3	4
10. Vérification régulière des filtres HEPA (en général tous les ans)	Oui	Oui	Oui
11. Les laboratoires et animaleries doivent pouvoir être fermés hermétiquement pour permettre une fumigation		Oui	Oui
12. Incinérateur, stérilisateur à vapeur, ou système d'élimination des carcasses et des déchets	Disponible	Oui	Oui sur place
13. Facilité de nettoyage du laboratoire et des animaleries : surfaces planes imperméables à l'eau et résistantes aux produits chimiques ; présence dans chaque pièce du laboratoire d'un point d'eau pour le lavage des mains et d'une douche d'urgence ainsi que d'un système de nettoyage des yeux, comme il convient pour les risques chimiques ou autres. Établissement de procédures en vue de nettoyages et de désinfections fréquentes pendant et à la fin de la période de travail.	Oui	Oui	Oui
14. Présence d'enceintes de sécurité biologique de classe I ou II	Oui	Oui	Oui
15. Présence d'enceintes de sécurité biologique de classe III		Oui	Oui
16. Système mécanique d'approvisionnement en air avec système de sécurité et alarme en cas de panne		Oui	Oui
17. Accès direct aux autoclaves et stérilisateurs à vapeur	Oui	Oui avec double entrée	Oui avec double entrée
18. Conservation des agents pathogènes spécifiés au laboratoire	Oui	Oui	Oui
19. Autoclave à deux portes formant sas		De préférence	Oui
20. Agent chargé de la sécurité et responsable du confinement	Oui	Oui	Oui
21. Formation spéciale du personnel et vérification des compétences requises	Oui	Oui	Oui
B) Discipline à l'intérieur du laboratoire			
22. Affiches d'information au niveau des zones de confinement pour indiquer la présence de danger ainsi que le nom et le numéro de téléphone de la (des) personne(s) responsable(s)	Oui	Oui	Oui
23. Affichage dans le laboratoire des protocoles d'urgence pour avertir le personnel des procédures à suivre en cas de fuite d'un agent pathogène ou pour évacuer le laboratoire en cas d'incendie ou de tout autre événement	Oui	Oui	Oui
24. Possibilité de fermeture à clef ou au verrou du laboratoire	Oui	Oui	Oui
25. Entrée réservée au personnel autorisé	Oui	Oui	Oui
26. Quand de besoin, port de vêtements de protection y compris gants, masques, lunettes de protection et respirateurs oro-nasaux ; les vêtements sont retirés avant de quitter le laboratoire	Oui	Oui	Oui
27. Lorsqu'une session de travail est en cours, fermeture des portes du laboratoire et ventilation assurée par extraction de l'air de la pièce de travail (quand des enceintes de sécurité microbiologiques sont utilisées, il convient de bien équilibrer le système de ventilation)	Oui	Oui	Oui
28. Interdiction de conserver ou de consommer de la nourriture ou des boissons à l'intérieur du laboratoire	Oui	Oui	Oui
29. Interdiction de fumer ou de se maquiller à l'intérieur du laboratoire	Oui	Oui	Oui
30. Interdiction de pipetter avec la bouche	Oui	Oui	Oui

Conditions requises pour le laboratoire et les animaleries	Groupe de confinement		
	2	3	4
B) Discipline à l'intérieur du laboratoire (suite)			
31. Réduire autant que possible la formation d'aérosols	Oui	Oui	Oui
32. Interdiction de jeter du matériel infectieux dans les éviers ou tout autre tuyau d'écoulement du laboratoire	Oui	Oui	Oui
33. Stockage en toute sécurité de la verrerie et des matériels utilisés avant désinfection. Les matériels à usage unique sont transportés en évitant les fuites dans des conteneurs solides. Le matériel souillé doit être autoclavé, incinéré ou rendu inoffensif par tout autre moyen, avant d'être éliminé. Le matériel ré-utilisable doit être décontaminé par des moyens appropriés.	Oui	Oui	Oui
34. Obligation d'enregistrer tout incident ou accident et de le signaler au responsable de la sécurité	Oui	Oui	Oui
35. Obligation de changer de vêtements à l'entrée dans le laboratoire et de porter des vêtements propres		Oui	Oui
36. Obligation à la sortie du laboratoire de retirer ses vêtements de protection et tout équipement	Oui	Oui	Oui
37. Obligation pour le personnel de prendre une douche et de changer de vêtements avant de sortir du laboratoire et de passer dans la zone propre		Il peut être nécessaire pour le personnel de se doucher avant de sortir et de porter des vêtements spéciaux à laisser dans le laboratoire en quittant le bâtiment	Oui
C) Manipulation des échantillons			
38. Informations sur les règles de conditionnement des échantillons avant envoi	Oui	Oui	Oui
39. Ouverture des colis arrivant par du personnel formé dans des locaux de réception appropriés	Oui	Oui	Oui
40. Obtention d'une licence pour le transport d'agents pathogènes d'un laboratoire agréé vers un autre laboratoire	Oui	Oui	Oui
41. Des procédures opératoires normalisées doivent être disponibles	Oui	Oui	Oui

1. Conditions requises supplémentaires pour le travail en animaleries

1. Les animaleries doivent être faciles à nettoyer avec des murs imperméables à l'eau et résistants aux produits chimiques utilisés dans celles-ci.
2. L'accès du personnel dans les zones de travail doit être limité ; des mesures de sécurité appropriées peuvent se révéler nécessaires pour les agents pathogènes à haut risque, telles que l'accès électroniquement contrôlé.
3. Le personnel doit porter des équipements de protection telles que blouses, bottes, gants à usage unique, masques, lunettes de sécurité ou respirateurs oro-nasaux chaque fois que cela est nécessaire ; les équipements sont portés dans les animaleries et retirés lors de la sortie du bâtiment.
4. Lorsqu'un travail est en cours, la porte de l'animalerie doit être fermée et la ventilation doit être assurée par extraction de l'air de la pièce (lorsque des enceintes de sécurité sont utilisées, il convient de prendre soin à équilibrer les systèmes de ventilation).
5. Il est interdit de conserver ou de consommer de la nourriture (chewing-gum, bonbons, pastilles pour la gorge, etc.) ou des boissons dans les animaleries.
6. Il est interdit de fumer ou de se maquiller dans les animaleries.

7. La verrerie et les autres matériels doivent être conservés en toute sécurité après désinfection. Les matériels à jeter doivent être transportés dans des conteneurs solides en évitant les fuites. Le matériel souillé doit être autoclavé, incinéré ou rendu inoffensif par tout autre moyen avant élimination. Le matériel ré-utilisable doit être décontaminé par des moyens appropriés.
8. Aucun produit infectieux ne doit être versé dans les tuyaux d'écoulement des animaleries sans un traitement préalable approprié.
9. Tout accident ou incident doit être enregistré et signalé à l'agent responsable de la sécurité.

L. CONCLUSION

Maintenir les meilleures règles de sécurité dans le laboratoire pour permettre à l'ensemble du personnel un travail dans des conditions optimales doit être la plus grande des priorités. Celles-ci pourront être atteintes par une étude circonspecte des principes appliqués, suivies par une application pratique aux locaux, à l'équipement, aux procédures opératoires et à l'hygiène. La formation du personnel de laboratoire doit être une priorité principale et aucun personnel ne doit être autorisé à travailler s'il n'a pas accompli et satisfait une formation appropriée. De nombreux articles et livres existent sur tous les aspects de ce sujet et sont recommandées en complément de ce chapitre (6, 9, 13, 14, 19).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ACHA P.N. & SZYFRES B. (2001). Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, Third Edition. Pan American Health Organisation, Scientific Publication. PAHO, Washington DC, USA.
2. ADVISORY COMMITTEE ON DANGEROUS PATHOGENS (1995). Categorisation of Biological Agents According to Hazard and Categories of Containment, Fourth Edition. Health and Safety Executive Books, P.O. Box 1999, Sudbury, Suffolk, CO10 6FS, UK. ISBN 0-7176-1038-1.
3. ADVISORY COMMITTEE ON DANGEROUS PATHOGENS (1998). Transmissible Spongiform Encephalopathy Agents: Safe Working and the Prevention of Infection. Spongiform Encephalopathy Advisory Committee. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
4. BARBEITO M.S., ABRAHAM G., BEST M., CAIRNS P., LANGEVIN P., STERRITT W.G., BARR D., MEULEPAS W., SANCHEZ-VIZCAINO J.M., SARAZA M., REQUENA E., COLLADO M., MANI P., BREEZE R., BRUNNER H., MEBUS C.A., MORGAN R.L., RUSK S., SIEGFRIED L.M. & THOMPSON L.H. (1995). Recommended biocontainment features for research and diagnostic facilities where animal pathogens are used. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **14**, 873–887.
5. BELL J.C., PALMER S.R. & PAYNE J.M. (1988). The Zoonoses. Edward Arnold, London, UK.
6. BERAN G.W. & STEELE J.H. (eds) (1994). Handbook of Zoonoses, Second Edition. Section A. (Bacterial, Rickettsial, Chlamydial and Mycotic Zoonoses) and Section B (Viral Zoonoses), CRC Press, USA.
7. CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY (1996). Containment Standards for Veterinary Facilities, Best M., ed. Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario, Canada.
8. COLLINS C.H. (1990). Health hazards in microbiology. *In*: Handbook of Laboratory Health and Safety Measures, Pal S.B., ed. Kluwer Academic Publications, Dordrecht, The Netherlands, 159–188.
9. COMITE EUROPEAN DE NORMALISATION (2000). EN12469:2000; Performance Criteria for Microbiological Safety Cabinets. Comité European de Normalisation, Rue de Strassart 36, B-1040 Brussels, Belgium.
10. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA) (1994). International Basic Safety Standards for Protection against Ionizing Radiation and for the Safety of Radiation Sources, Interim Edition. Safety Series No. 115-I. IAEA, Vienna, Austria.
11. OFFICE OF BIOSAFETY, LABORATORY CENTRE FOR DISEASE CONTROL, HEALTH AND WELFARE CANADA (1996). Laboratory Biosafety Guidelines, Second Edition. Ministry of Supply and Services Canada, Cat. No. MR 21-2/1996.
12. RAYBURN S.R. (1990). The Foundations of Laboratory Safety (a Guide for the Biomedical Laboratory). Springer-Verlag, New York, USA.

13. RICHMOND Y. (ed) (1996–2002). Anthology of Biosafety: I–V. American Biological Safety Association. Mundelein, Illinois, USA.
14. SEWELL D.L. (1995). Laboratory associated infections and biosafety. *Clin. Microbiol. Rev.*, **8**, 389–405.
15. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (2002). ARS Facilities Design Standards, Section 9 Biohazard Containment Design. <http://www.afm.ars.usda.gov/ppweb/242-01m.htm#H304>
16. US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION AND NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (2007). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Fifth Edition., Washington DC, USA. <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl5/bmbl5toc.htm>
17. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, PUBLIC HEALTH SERVICE, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, AND NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (2000). Primary Containment for Biohazards: Selection, Installation and Use of Biological Safety Cabinets, Second Edition. United States Government Printing Office, Washington DC, USA.
18. WOOD M. & SMITH M.W. (EDS) (1999). Health and Safety in Laboratory Animal Facilities. Royal Society of Medicine Press, London, UK, pp. 249.
19. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2004). Laboratory Biosafety Manual, Third Edition. WHO, Geneva, Switzerland.

*
* *

GESTION DE LA QUALITÉ DANS LES LABORATOIRES DE DIAGNOSTIC VÉTÉRINAIRE

RÉSUMÉ

Des résultats de laboratoires fiables sont essentiels pour le diagnostic et la surveillance, ainsi que dans le cadre des échanges commerciaux. De tels résultats sont obtenus par la mise en place de bonnes pratiques de gestion, d'épreuves fiables et d'un étalonnage des méthodes, de techniques appropriées, d'un contrôle qualité et d'une assurance qualité, tout cela fonctionnant dans un système de gestion de la qualité. Ces sujets comprennent un domaine complexe d'importance critique dans la conduite des épreuves et dans l'interprétation des résultats de ces épreuves. Ce sujet peut être nommé gestion de la qualité au laboratoire, et inclure des éléments de gestion, d'instructions et de techniques. Un programme de gestion de la qualité permet au laboratoire de démontrer qu'il fonctionne avec un système qualité efficace et qu'il est capable de fournir des résultats techniquement fiables. De plus, un programme de gestion de la qualité doit permettre au laboratoire de démontrer qu'il répond aux attentes de ses clients ou de ses utilisateurs. La nécessité de reconnaissance mutuelle des résultats des tests pour les échanges internationaux et l'acceptation de normes internationales telles que la Norme Internationale 17025 ISO/IEC¹ (7) pour l'accréditation des laboratoires touchent également les besoins et les exigences des programmes de gestion de la qualité des laboratoires. L'OIE a publié des normes détaillées à ce sujet (10). Ce chapitre n'est pas destiné à réitérer les exigences de ces documents ISO ou OIE. Il souligne plutôt les questions importantes et les considérations qu'un laboratoire doit aborder dans le plan et le maintien de son programme de gestion de la qualité.

ÉLÉMENTS CLÉ DU PLAN ET DU MAINTIEN DU PROGRAMME DE GESTION DE LA QUALITÉ AU LABORATOIRE

Afin d'assurer que le programme de gestion de la qualité est approprié et efficace, le plan doit être étudié prudemment. Les principales catégories d'éléments et de questions clé, ainsi que les activités dans chacune de ces catégories sont indiquées dans les 7 sections suivantes de ce chapitre.

1. Le travail, les responsabilités et les objectifs du laboratoire

De nombreux facteurs affectent les éléments nécessaires et les exigences des programmes de gestion de la qualité. Ces facteurs comprennent :

- i) Le type de tests effectués ;
- ii) L'utilisation des résultats des tests ;
- iii) L'impact d'un résultat douteux ou erroné ;
- iv) Le niveau de tolérance du risque et la responsabilité ;
- v) Les besoins du client (ex : sensibilité et spécificité de la méthode de diagnostic, les coûts, le délai de réponse) ;
- vi) Le rôle du laboratoire dans la législation du travail ou dans les programmes réglementaires ;

1 Organisation Internationale pour la Standardisation/Commission Internationale Electrochimique

- vii) Le rôle du laboratoire dans l'assistance, la confirmation et/ou la surveillance du travail d'autres laboratoires ; et
- viii) Les objectifs commerciaux du laboratoire, incluant la nécessité de la reconnaissance par les parties tiers et/ou l'accréditation.

2. Normes, guides et références

Il est recommandé que le laboratoire choisisse des normes sûres et acceptées et des guides pour aider à la mise en place du programme de gestion de la qualité. La norme de l'OIE est à cet égard un guide utile (10). Pour les laboratoires désirant l'accréditation, l'utilisation de l'ISO/IEC 17025 (7) ou de la norme de l'OIE (10) sera essentielle. Des informations complémentaires sur les normes pourront être obtenues auprès des organismes des normes nationaux de chaque pays, auprès de la Coopération Internationale d'Accréditation des Laboratoires (ILAC pour *International Laboratory Accreditation Cooperation*), et auprès des organismes d'accréditation (par exemple, l'Association Nationale des Autorités du diagnostic ([NATA pour *National Association of Testing Authorities*] en Australie et l'Association Américaine d'Accréditation des Laboratoires ([A2LA pour *American Association for Laboratory Accreditation*] aux États Unis d'Amérique). Des organisations techniques et internationales telles que l'AOAC Internationale (anciennement l'Association des Chimistes Analytiques Officiels, *Association of Official Analytical Chemist*) et l'ISO publient des références utiles, des guides, et/ou des normes qui complètent les exigences générales de l'ISO/IEC 17025. La Norme Internationale ISO 9001 (8) est une norme générale pour les systèmes de gestion de la qualité (l'une des nombreuses normes du groupe communément appelé la « série des ISO 9000 »). Alors qu'un laboratoire peut mettre en œuvre un système de gestion de la qualité en accord avec les exigences de l'ISO 9001, l'enregistrement ou la certification est utilisé pour indiquer la conformité avec cette norme, mais pas l'accréditation car l'ISO 9001 n'est pas une norme de compétence technique (voir Section 3 ci-dessous).

3. Accréditation

Si un laboratoire estime qu'il a besoin d'une reconnaissance formelle de son programme de gestion de la qualité, alors 3 phases de vérification de sa conformité avec le(s) norme(s) sélectionnée(s) seront nécessaires. L'ILAC a publié des obligations spécifiques et des guides pour les laboratoires et les organismes d'accréditation. L'ISO/IEC 17025 doit être utilisée pour l'accréditation dans le système ILAC. Les définitions concernant l'accréditation des laboratoires sont données dans la Norme Internationale ISO/IEC 17000 (5) L'accréditation est liée à la notion de *compétence* et ceci est d'une grande importance car il signifie bien plus que d'avoir et de suivre des procédures documentées. Avoir cette compétence signifie également que le laboratoire :

- i) a des méthodes techniquement valides et des méthodes de tests validés, des procédures et des cahiers des charges qui sont documentés en accord avec les exigences des normes sélectionnées et/ou des directives ;
- ii) a le personnel qualifié adéquat et correctement formé qui comprend les bases scientifiques au-delà des procédures ;
- iii) a l'équipement approprié et correct ;
- iv) a des locaux adaptés et le contrôle de l'environnement ;
- v) a les procédures et les cahiers des charges qui garantissent des résultats corrects et fiables ;
- vi) peut prévoir les besoins techniques et les problèmes et mettre en œuvre en permanence des améliorations ;
- vii) peut faire face et prévenir les problèmes techniques qui peuvent survenir ;
- viii) peut estimer précisément et contrôler l'incertitude dans les épreuves ;
- ix) peut démontrer la capacité à conduire les méthodes de test utilisées ; et
- x) a démontré sa compétence à générer des résultats techniquement fiables.

4. Sélection d'un organisme d'accréditation

Afin que l'accréditation facilite l'acceptation des résultats des épreuves du laboratoire pour les échanges commerciaux, l'accréditation doit être reconnue par la communauté internationale. L'organisme d'accréditation doit donc être reconnu comme compétent pour accréditer les laboratoires. Les programmes pour la reconnaissance des organismes d'accréditation sont, dans le système de l'ILAC, basés sur les exigences de la Norme Internationale ISO/IEC 17011 (6). Il est possible d'obtenir des informations sur la reconnaissance des organismes d'accréditation auprès des organisations qui les reconnaissent, tel que la Coopération Nationale pour l'Accréditation des Laboratoires (NACLA pour *National Cooperation for Laboratory Accreditation*), la Coopération d'Accréditation des Laboratoires d'Asie-Pacifique (APLAC pour *Asia-Pacific Laboratory Accreditation*

Cooperation), la Coopération d'Accréditation Interaméricaine (IAAC pour *Interamerican Accreditation Cooperation*), et la Coopération Européenne pour l'Accréditation (EA).

5. Détermination de l'étendue du programme de gestion de la qualité et/ou de l'accréditation du laboratoire

Le programme de gestion de la qualité doit idéalement couvrir tous les domaines d'activité affectant tous les tests effectués au laboratoire. Cependant, dans le cadre de l'accréditation, le laboratoire doit déterminer l'ensemble des tests devant être inclus dans l'accréditation. Les facteurs qui peuvent affecter le choix du laboratoire pour l'accréditation inclus :

- i) La disponibilité et le coût du personnel nécessaire, les locaux et l'équipement ;
- ii) Le coût de la surveillance environnementale vis-à-vis de la possibilité de contamination croisée ;
- iii) La date limite pour l'accréditation ;
- iv) L'impact des résultats du test ;
- v) Le nombre de tests effectués ;
- vi) Si le test effectué entre ou non dans une routine ;
- vii) Si une partie du test est sous-traitée à l'extérieur ;
- viii) L'assurance qualité nécessaire pour le matériel, les réactifs et les milieux ;
- ix) La disponibilité de produits de référence (ex : des réactifs normalisés de référence, des échantillons internes de contrôle qualité, des cultures de références) ;
- x) La disponibilité de la maîtrise des tests ;
- xi) La disponibilité, auprès de sources réputées, de normes et/ou de méthodes de tests totalement valides ;
- xii) L'évaluation et la validation des méthodes de tests à effectuer ;
- xiii) La complexité technique de(s) la(les) méthode(s) ; et
- xiv) Le coût de la formation pour maintenir la compétence du personnel à réaliser les tests.

Les organismes d'accréditation accréditent également les fournisseurs et les opérateurs des programmes de maîtrise des épreuves, et peuvent avoir recours à l'utilisation de fournisseurs accrédités, autant que cela est possible, afin de délivrer au laboratoire un certificat d'accréditation. Il est recommandé de pratiquer l'accréditation selon le Guide ISO/IEC 43-1 (évaluation selon ILAC G13:08/2007) (3, 4).

6. Méthodes d'analyse

L'ISO/IEC 17025 exige l'utilisation de techniques de test appropriées et a des exigences pour la sélection, le développement et la validation. Le document de l'OIE (10) fournit également les exigences pour la sélection et la validation.

Ce *Manuel terrestre* donne des recommandations sur le choix des méthodes d'analyse qui peuvent être utilisées pour les tests pour les échanges internationaux et le diagnostic dans les chapitres sur les maladies spécifiques. De plus, une liste d'épreuve pour les échanges internationaux est fournie. Comme mentionné dans l'introduction à cette liste, les épreuves prescrites qui sont listées sont celles qui sont exigées par le *Code sanitaire pour les animaux terrestres* de l'OIE. Ces épreuves sont considérées comme étant validées de façon adéquate pour donner des résultats fiables dans le but de qualifier les animaux pour les mouvements internationaux. Sont également listées des épreuves de substitution qui sont valables pour le diagnostic de maladie au sein d'une réglementation locale, mais leur validation peut être limitée. Ces épreuves sont généralement des épreuves sérologiques.

Dans la profession vétérinaire, d'autres méthodes de référence² ou des méthodes pleinement validées³ peuvent ne pas être disponibles alors qu'il serait préférable de les utiliser. De nombreux laboratoires vétérinaires développent ou modifient des méthodes, et la plupart de ces laboratoires ont des programmes d'épreuves qui utilisent des méthodes qui ne sont pas des méthodes de référence, ou une combinaison de méthodes de référence et de méthodes qui n'ont pas ce statut. Dans les laboratoires vétérinaires, même avec l'utilisation de

2 Méthodes de référence : méthodes publiées dans des normes internationales, nationales ou régionales

3 Méthodes validées : méthodes ayant subi une étude pleinement collaborative et qui sont publiées ou fournies par des organismes techniques faisant autorité tel que l'AOAC internationale.

méthodes de référence, quelques évaluations internes, optimisation, et/ou validation doivent être faites pour assurer la validité des résultats.

Les clients et le personnel du laboratoire doivent avoir une compréhension claire des caractéristiques du test et les clients doivent être informés si la méthode utilisée n'est pas normalisée. De ce fait, beaucoup de laboratoires de diagnostic vétérinaire ont besoin de démontrer leur compétence dans le développement, l'adaptation et la validation des méthodes de test.

Ce *Manuel terrestre* donne un guide plus détaillé et spécifique sur la sélection du test de diagnostic, l'optimisation, la normalisation et la validation dans le Chapitre 1.1.4., « Principes de la validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses ». Les paragraphes suivants discutent les problèmes de méthode de test qui sont les plus importants pour ceux impliqués dans la gestion de la qualité du laboratoire.

a) Sélection de la méthode de diagnostic

La fiabilité des résultats commence par la sélection d'une technique de diagnostic qui répond aux attentes des clients et aux besoins du diagnostic. Les considérations à prendre en compte pour le choix d'une technique de diagnostic incluent :

- i) Acceptation internationale ;
- ii) Acceptation par la communauté scientifique ;
- iii) Méthode utilisant une technologie actuelle ou récente ;
- iv) Caractéristiques de la performance (ex : spécificité et sensibilité analytique et diagnostique, répétabilité, reproductibilité, taux d'isolement, seuil limite de détection, précision, exactitude, et incertitude) ;
- v) Comportement en fonction des espèces et populations intéressées ;
- vi) Ressources et temps disponibles pour le développement, l'adaptation et/ou l'évaluation ;
- vii) Durée de la réalisation/durée de la rotation ;
- viii) Type d'échantillon (ex : sérum, tissu) et sa qualité ou de son état attendu à l'arrivée au laboratoire ;
- ix) Sujet d'analyse (ex : anticorps, antigène) ;
- x) Moyens et technologie mis en œuvre dans le laboratoire ;
- xi) Nature de la demande de l'examen (ex : export, import, contrôle local, confirmation, utilisation pour animal individuel, utilisation pour un élevage) ;
- xii) Attentes du client ;
- xiii) Facteurs de sécurité ;
- xiv) Nombre de tests devant être faits ;
- xv) Coût du test par échantillon ;
- xvi) Existence de normes de références incluant les réactifs de références ; et
- xvii) Disponibilité des programmes de maîtrise du diagnostic.

b) Optimisation et normalisation de la méthode de diagnostic

Une fois que la méthode a été choisie, elle doit être établie au laboratoire. Que la méthode ait été développée au laboratoire ou importée d'une source extérieure, une optimisation additionnelle est souvent nécessaire. L'optimisation consiste en une série d'expérimentations et l'analyse consécutive des données obtenues. L'optimisation établit les caractéristiques critiques et les normes de performances pour la réalisation du test et son utilisation en intégrant les performances correctes du test. L'optimisation doit assurer que la méthode est réalisée à l'aide d'une analyse probabiliste. L'optimisation doit aussi déterminer :

- i) Les caractéristiques critiques de l'équipement et des instruments ;
- ii) Les caractéristiques critiques pour les réactifs (ex : chimiques, biologiques) ;
- iii) Caractéristiques critiques des normes de référence, des matériels de référence, et des contrôles internes ;
- iv) Robustesse (si applicable) ;

- v) Points de contrôle critiques et niveau d'acceptabilité, attribut et comportement aux points de contrôle critiques, utilisation de procédures statistiquement acceptables ;
- vi) La mise en place du contrôle qualité impose la gestion des points de contrôle critiques ;
- vii) Le type, le nombre, le niveau, la fréquence et/ou l'organisation des contrôles en anneaux nécessaires ;
- viii) Les besoins pour le comportement du contrôle pour une acceptation ou un rejet non subjectifs des résultats du test ;
- ix) Les éléments d'une méthode de diagnostic établie et documentée pour une utilisation par l'équipe du laboratoire ; et
- x) Le niveau de compétences techniques du personnel qui effectue et/ou interprète le test.

c) Validation de la méthode de diagnostic

Une autre validation évalue le test pour son adaptation à l'usage demandé. La validation établit les caractéristiques de performance de la méthode de diagnostic comme la sensibilité, la spécificité, le niveau d'isolement ; et les paramètres du diagnostic comme les seuils de positivité/négativité, le titre de référence ou significatif. La validation doit être effectuée en utilisant une procédure optimisée, documentée et fixée. En fonction de la logistique opérée et des facteurs de risque, la validation peut fournir un certain nombre de données et de mesures qui nécessitent l'utilisation d'une méthode statistique appropriée pour l'analyse des données. La méthode de validation est décrite dans le Chapitre 1.1.4., et dans le Chapitre 1.1.5., « Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses ».

La validation peut inclure :

- i) Des études terrains et/ou épidémiologiques ;
- ii) La comparaison avec d'autres méthodes de préférences des méthodes de référence ;
- iii) La comparaison avec des étalons de référence (s'ils sont disponibles) ;
- iv) Des études en collaboration avec d'autres laboratoires utilisant la même méthode documentée, et incluant l'échange d'échantillons dont la composition ou le titre sont de préférence non révélés. Il est préférable que ces échantillons soient fournis par un laboratoire qualifié qui organise l'étude et évalue les résultats obtenus par les participants ;
- v) La reproduction des données à partir d'une méthode de référence acceptée, ou à partir d'une publication de haut niveau ;
- vi) Des études avec une épreuve infectieuse expérimentale ; et
- vii) L'analyse des données du contrôle qualité interne.

La validation est toujours un équilibre entre les coûts, les risques, et les possibilités techniques. Les organismes d'accréditation reconnaissent également qu'il y a de nombreux cas pour lesquels l'exactitude et la précision ne peuvent être données que de façon simplifiée.

Il est également important de développer des critères et des procédures pour la corrélation entre le résultat du test et le statut de l'animal concernant une maladie donnée ou les conséquences prévues par la réglementation (par exemple réaliser un nouveau test sur l'échantillon ou confirmer le résultat s'il fut obtenu par un test de dépistage).

d) Incertitude

Les laboratoires doivent être capables d'estimer l'incertitude des méthodes de diagnostic telles qu'elles sont effectuées au laboratoire. Ceci inclue les techniques utilisées par le laboratoire pour calibrer l'équipement (7).

La détermination de la mesure de l'incertitude (MI) n'est pas nouvelle pour certains secteurs de la métrologie. Cependant, l'application des principes de MI aux laboratoires des sciences du vivant est nouvelle. La plupart du travail jusqu'à aujourd'hui concernant la MI est destinée à des tests autres que les sciences du vivant, et une grande partie du travail a été théorique. Cependant, comme l'accréditation devient plus importante, les applications se sont développées pour d'autres secteurs. Comme la MI peut être appliquée à tous les résultats dérivés d'une procédure particulière, il est important de noter qu'elle n'implique pas un doute sur la validité du résultat du diagnostic ou d'autres mesures. De même, elle n'est pas équivalente à une *erreur*. Elle peut être vue comme une expression quantitative de la fiabilité, et elle est

communément exprimée par un nombre après un signe +/- (ex : la valeur exacte se trouve comprise dans une échelle énoncée, puisque la MI est exprimée comme une échelle). La déviation standard et l'intervalle de confiance sont des exemples de l'expression de la MI. Un exemple de l'utilisation de la déviation standard pour exprimer un doute est la limite autorisée des contrôles de test en anneau pour une épreuve immuno-enzymatique (ELISA), communément exprimé comme SD +/- n .

Bien que la détermination et l'expression de la MI n'aient pas été normalisées pour les laboratoires de diagnostic vétérinaire (ou médicaux, alimentaires, ou de l'environnement), il existe quelques directions fiables.

La MI doit être estimée dans le laboratoire pour chaque méthode comprise dans le cadre de l'accréditation. Ceci peut être estimé par une série de diagnostics sur des échantillons témoins. La MI peut également être estimée par utilisation de caractéristiques publiées (9), mais le laboratoire doit d'abord démontrer l'acceptabilité de la réalisation de la méthode. Les agences gouvernementales doivent aussi définir des objectifs pour les valeurs de la MI des méthodes officielles (ex : *Health Canada*). Des organisations techniques réputées, et les organismes d'accréditation (ex : AOAC Internationale, ISO, NATA, A2LA, SCC, UKAS, Eurachem, et la Coopération sur la Traçabilité Internationale dans la Chimie Analytique [CITAC]) dispensent des cours et/ou fournissent des directives sur la MI pour les laboratoires visant l'accréditation. Le Codex Alimentarius, qui spécifie les normes pour les diagnostics alimentaires, considère qu'il n'est pas nécessaire pour un laboratoire de calculer une estimation supplémentaire de MI si le laboratoire respecte les principes du Codex en ce qui concerne la qualité : par exemple que le laboratoire est accrédité à ISO/IEC 17025, et utilise en outre des techniques validées (ex : il connaît les paramètres applicables comme la sensibilité et la spécificité, aussi bien que l'intervalle de confiance autour de ces paramètres), participe aux programmes de test de compétence et des études en collaboration et utilise des procédures appropriées de contrôle qualité internes.

Les exigences pour « l'utilisation de procédures appropriées de contrôle qualité internes » impliquent que le laboratoire doit utiliser des procédures de contrôle qualité qui couvrent toutes les sources majeures d'incertitude. Il n'est pas nécessaire de couvrir chaque élément séparément. Les éléments peuvent être estimés avec des expériences au laboratoire (estimations de Type A), ou auprès d'autres sources (matériel de référence, certificats d'étalonnage, etc.) (estimations de Type B). Une procédure traditionnelle de contrôle d'échantillon, effectuée de nombreuses fois par tous les individus qui analysent et sur tous les postes, couvre habituellement toutes les sources majeures d'incertitude excepté peut-être la préparation de l'échantillon. La variation des échantillons témoins peut être utilisée comme une estimation de ces sources combinées d'incertitude.

L'ISO/IEC 17025 exige que le laboratoire identifie toutes les sources majeures d'incertitude, et obtienne des estimations fiables de MI. Les laboratoires peuvent souhaiter établir des significations acceptables, des critères, et/ou des scores des points de contrôle critiques pour chaque élément. Lorsque cela est approprié, les laboratoires peuvent introduire un contrôle qualité approprié aux points de contrôle critiques associés à chaque source, ou chercher à réduire la taille d'un élément. Les sources d'incertitude comprennent l'échantillonnage, les conditions de stockage, une altération de l'échantillon, l'extraction et l'obtention, la qualité des réactifs, la pureté du matériel de référence, les manipulations volumétriques, les conditions environnementales, la contamination, l'altération de l'équipement, le biais du personnel, la variation biologique, et d'autres causes inconnues ou fait du hasard. Le laboratoire doit aussi prendre en considération toute erreur systématique connue. (Voir également la Section 6.b, étapes i à vii). Les erreurs systématiques (biais) doivent soit être corrigées par des changements dans la méthode utilisée, ajustées mathématiquement, ou bien, elles doivent être notées dans le rapport officiel. Si un réajustement est effectué dans la procédure, il peut ou pas être nécessaire de re-évaluer l'incertitude. Si un réajustement est effectué pour corriger le biais, alors une nouvelle source d'incertitude est introduite (l'incertitude de la correction). Ceci doit être ajouté à l'estimation de la MI.

Il y a 3 façons principales d'estimer la MI :

1. L'approche des composants (ou l'approche « sens dessus dessous »), où toutes les sources d'incertitude sont identifiées, une estimation raisonnable est faite pour chaque élément, un modèle mathématique est développé afin de lier les éléments, et les variations sont combinées en utilisant les lois de la propagation des erreurs (1).
2. L'approche de contrôle de l'échantillon (ou « approche contrôlée par le bas »), où les mesures sur un matériel de contrôle stable sont utilisées pour estimer la variation combinée de nombreux éléments. La variation de sources supplémentaires doit être ajoutée.
3. L'approche des caractéristiques de la méthode, lorsque les données de l'exécution d'une étude collaborative valide sont utilisées comme incertitudes combinées (les autres sources doivent être ajoutées). Les laboratoires doivent satisfaire des critères définis concernant le biais et la répétabilité de

la MI estimée comme valide. Ils doivent être plus larges que ceux qui seraient obtenus par des laboratoires compétents utilisant leurs propres échantillons témoins ou model d'éléments.

Des informations complémentaires sur l'analyse de l'incertitude sont consultables dans le guide Eurachem (Eurachem Guide to Quantifying Uncertainty in Measurement) (2).

e) Mise en œuvre et utilisation de la méthode de diagnostic

Les personnes réalisant l'analyse doivent être en mesure de démontrer l'efficacité de l'utilisation de la technique de diagnostic avant de produire des rapports de résultats, et cela sur une base régulière.

Le laboratoire doit assurer, une utilisation appropriée et une gestion de projet documentée, la conservation des enregistrements, la gestion des données, et l'archivage des procédures, et qu'il peut reconstituer si besoin tous les événements liés au choix de la technique, au développement, à l'optimisation, à la normalisation, à la validation, à la mise en œuvre et à l'utilisation. Ceci inclus les activités de contrôle qualité et d'assurance qualité.

7. Élaboration de la stratégie

Une amélioration continue est essentielle. Il est recommandé que le laboratoire soit informé et le reste sur les normes et les méthodes utilisées pour démontrer la compétence du laboratoire et établir et maintenir une validité technique. Les méthodes par lesquelles cela peut être accompli comprennent :

- i) Être présent à des conférences ;
- ii) Participer à des organisations locales et internationales ;
- iii) Participer à l'écriture de normes nationales et internationales (ex : participation aux comités sur l'ILAC et l'ISO) ;
- iv) Consulter les publications ;
- v) Visiter d'autres laboratoires ;
- vi) Effectuer des travaux de recherche ;
- vii) Participer à des programmes de coopération (ex : Institut Inter-Américain pour la Coopération en Agriculture) ;
- viii) Échanger des procédures, des méthodes, des réactifs, des échantillons, du personnel, et des idées ;
- ix) Quand cela est possible, obtenir une accréditation et les contrôles suivants par un tiers lui-même reconnu comme compétent pour délivrer l'accréditation
- x) Assurer une formation planifiée et continue des personnels sur les techniques et le développement de celles-ci ;
- xi) Faire réaliser des audits sur la gestion en place ;
- xii) Analyser les commentaires des clients ; et
- xiii) Mettre en œuvre des actions préventives.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE (1997). ANSI/NCSL Z540-2-1997, US Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, First Edition. American National Standards Institute, 1819 L Street, NW, Washington, DC 20036, USA.
2. EURACHEM (2000). Guide to Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Second Edition. Eurachem Secretariat, as Secretary, Mr Nick Boley, LGC Limited, Queens Road, Teddington, Middlesex TW11 0LY, United Kingdom.
3. ILAC G13:08/2007 (2007). Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). Secretariat, NATA, 7 Leeds Street, Rhodes, NSW 2138, Australia.

4. ISO/IEC GUIDE 43-1 (1997). Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH-1211, Geneva 20, Switzerland.
5. ISO/IEC INTERNATIONAL STANDARD 17000 (2004). Conformity assessment – Vocabulary and general principles. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.
6. ISO/IEC INTERNATIONAL STANDARD 17011 (2004)³. Conformity assessment -- General requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.
7. ISO/IEC INTERNATIONAL STANDARD 17025 (2005). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.
8. ISO INTERNATIONAL STANDARD 9001 (2000). Quality management systems – Requirements. International Organization for Standardization (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.
9. ISO/TS 21748 (2004). Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.
10. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (2008). Standard for Management and Technical Requirements for Laboratories Conducting Tests for Infectious Animal Diseases. *In*: OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases, Second Edition. World Organisation for Animal Health (OIE: Office International des Epizooties), 12 rue de Prony, 75017 Paris, France, 1–25.

*

* *

3 La norme internationale ISO/IEC 17011 remplace le Guide 58 ISO/IEC (1993). Systèmes d'accréditation de laboratoires d'essais et d'étalonnages -- Prescriptions générales pour la gestion et la reconnaissance.

PRINCIPES DE LA VALIDATION DES ÉPREUVES DE DIAGNOSTIC DES MALADIES INFECTIEUSES

INTRODUCTION

La validation d'une épreuve de diagnostic consiste à déterminer et à évaluer son adéquation à un usage particulier et comprend l'optimisation et l'évaluation des performances diagnostiques de l'épreuve. Une épreuve validée pour une maladie infectieuse donne des résultats qui identifient la présence de la substance particulière à analyser (composant d'un agent infectieux ou anticorps induit par celui-ci par exemple) et permet des prédictions quant au statut sanitaire des individus éprouvés. Les épreuves appliquées à des individus ou des populations ont de nombreux objectifs, tels que renseigner sur l'absence d'une maladie dans une région ou un pays, la prévention de la diffusion d'une maladie par les échanges commerciaux, l'éradication d'une infection dans une région ou un pays, la confirmation d'un diagnostic de cas cliniques, l'estimation de la prévalence d'une maladie afin de faciliter l'analyse du risque, l'identification des animaux infectés par la mise en œuvre de mesures de contrôle, et la classification des animaux par rapport à la santé de l'élevage ou le statut immunitaire après vaccination. Une épreuve peut être, à elle seule, validée pour un ou plusieurs objectifs en optimisant ses performances diagnostiques pour chaque objectif (ex. établir une sensibilité diagnostic (SeD) élevée (telle que 99,99 %) associée à une spécificité diagnostic (SpD) plus faible pour une épreuve de dépistage, ou inversement, établir une SpD élevée associée à une SeD plus faible pour une épreuve de confirmation).

Les principes de validation discutés dans ce chapitre s'appliqueront essentiellement aux méthodes de détection des anticorps dans le sérum grâce à un test ELISA par exemple. Cependant, ces mêmes principes peuvent être appliqués à la validation des épreuves qui détectent d'autres sujets d'analyse dans le sérum ou les tissus. Le Chapitre 1.1.5., « Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses » étend les principes soulignés ici aux épreuves de diagnostic moléculaires qui sont des méthodes de détection directe d'un agent infectieux.

Il suffit de considérer les paramètres pouvant affecter les performances d'une épreuve pour connaître les critères essentiels dans le processus de validation. Ces paramètres peuvent être classés en 3 catégories : (a) l'échantillon : les interactions hôte/organisme modifiant la composition de la substance à analyser et la concentration dans l'échantillon de sérum ; (b) l'épreuve : des facteurs liés au technicien ou des variables physiques, chimiques, biologiques peuvent compromettre la capacité de l'épreuve à détecter une substance spécifique dans l'échantillon ; (c) le résultat de l'épreuve : l'aptitude du résultat de l'épreuve, dérivée du système d'analyse, à prévoir avec exactitude le statut de l'individu ou de la population par rapport à la substance à analyser concernée.

Les facteurs affectant la concentration et la composition de la substance à analyser dans l'échantillon de sérum sont essentiellement imputables à l'hôte. Ils sont soit inhérents (par exemple : âge, sexe, race, statut nutritionnel, gestation, réponse immunitaire), soit acquis (par exemple : immunité passive, immunité active obtenue par vaccination ou infection). Les facteurs non liés à l'hôte, comme la contamination ou la détérioration de l'échantillon peuvent également avoir une incidence sur la substance à analyser de l'échantillon.

Les facteurs susceptibles d'affecter l'exactitude analytique de l'épreuve peuvent inclure les instruments utilisés, une erreur du technicien, le choix du réactif (chimique ou biologique) et l'étalonnage, la précision et les seuils d'acceptation des témoins, les contenants de la réaction, la qualité de l'eau, le pH et l'ionisation des solutions tampons et diluants, les températures et durées

d'incubation, ainsi que d'erreurs introduites par la détection de sujets d'analyse étroitement apparentés comme des anticorps qui croisent avec différents agents pathogènes ou micro-organismes, des facteurs rhumatoïdes ou des anticorps hétérophiles.

Les mesures qui déterminent la capacité du résultat de l'épreuve à permettre de tirer des conclusions précises sur l'infection de l'hôte¹ ou le statut de la substance à analyser chez cet hôte sont la SeD, la SpD et la prévalence de la maladie au sein de la population ciblée par l'épreuve. La SeD et la SpD découlent des résultats des épreuves effectuées sur des échantillons obtenus à partir d'animaux de référence sélectionnés. Les méthodes utilisées pour sélectionner les animaux de référence sont critiques par rapport à la précision de l'estimation (5). Le degré de représentativité des animaux de référence pour toutes les variables liées à l'hôte ou à l'environnement dans la population ciblée par l'épreuve a une incidence majeure sur l'exactitude de l'interprétation des résultats de l'épreuve. Par exemple, les personnes expérimentées en matière de diagnostic savent qu'une épreuve validée à partir d'échantillons provenant de bovins du Nord de l'Europe risque de ne pas donner des résultats valables pour des populations bovines différentes en Afrique.

La capacité d'un résultat d'épreuve positif ou négatif à prévoir avec précision le statut infectieux et/ou le risque d'exposition d'un animal ou d'une population d'animaux est l'objectif majeur de la validation de l'épreuve. Cette capacité ne dépend pas seulement de la précision et de l'exactitude de l'épreuve (avec des réactifs correctement caractérisés et normalisés) et d'estimations déduites avec soin de la SeD et de la SpD, mais aussi et surtout de la prévalence de l'infection dans la population ciblée ou de la probabilité qu'un animal soit infecté sur la base de critères cliniques. Sans une estimation actuelle de la prévalence de la maladie étudiée au sein de cette population ou de la probabilité d'infection d'un animal seul, l'interprétation du résultat d'une épreuve positif ou négatif sera compromise.

Nombre de facteurs doivent à l'évidence être pris en compte avant qu'une épreuve ne puisse être considérée comme étant « validée » (5, 16). Cependant, la question reste posée de savoir si la validation d'une épreuve est un processus limité dans le temps pendant lequel seuls les facteurs intrinsèques de l'épreuve sont optimisés et normalisés, ou si elle doit impliquer une évaluation continue des performances de l'épreuve pendant toute la durée d'utilisation de celle-ci. Aussi l'expression « épreuve validée » donne-t-elle lieu à des interprétations diverses selon les personnes effectuant les diagnostics de laboratoires et les cliniciens vétérinaires. Nous donnerons donc une définition pratique de la validation d'une épreuve, applicable aux méthodes décrites ci-après. De manière idéale, toutes les épreuves de diagnostic devraient être validées pour un ou plusieurs objectifs, mais en pratique il y a parfois des limites à l'accomplissement de la validation.

DÉFINITIONS DE LA VALIDATION D'UNE ÉPREUVE

Une épreuve validée fournit avec régularité des résultats permettant d'identifier des animaux comme positifs ou négatifs par rapport à une substance à analyser ou un procédé (par exemple : anticorps, antigène ou induration à l'endroit de l'épreuve cutanée) et, par déduction, de prévoir avec précision le statut infectieux et/ou le risque d'exposition des animaux avec un degré prédéterminé de certitude statistique². Cette définition implique la condition préalable que le protocole du test ait été correctement développé, optimisé et normalisé afin d'obtenir des performances qui soient cohérentes avec l'objectif pour laquelle l'épreuve a été conçue.

1 Dans cet article, les termes « positif » et « négatif » ont été réservés aux résultats des tests ; ils ne font jamais référence à l'infection ou au statut anticorps/antigène de l'hôte. Chaque fois qu'il est fait allusion aux mots « infection » ou « substance à analyser », il est entendu que tout mode d'exposition à un agent infectieux peut être détecté par une méthode directe (par exemple, antigène) ou indirecte (par exemple, anticorps).

2 Dans cette définition, la SeD et la SpD représentent les caractéristiques de la performance du test pour une population cible donnée. Elles déterminent – avec la prévalence de la maladie dans la population – la probabilité qu'un test donné reflète le statut réel de l'animal. Un test peut être reconnu comme valide si les estimations fiables de la SeD et la SpD pour une population cible donnée sont disponibles. Cela n'inclue pas de valeurs seuils minimales pour ces paramètres. En pratique, les valeurs faibles de SeD et SpD ou des problèmes de diagnostic dus à une faible prévalence sont compensés par le plan d'échantillonnage ou en combinant de multiples tests de diagnostic dans un programme de tests parallèles ou en série. La sélection des tests, le mode d'échantillonnage, la combinaison des tests multiples dans un programme de tests et la règle d'interprétation des résultats définissent le processus du diagnostic.

Le présent chapitre met l'accent sur les principes qui sous-tendent le développement et la pérennité d'une épreuve validée. Les versions précédentes du présent chapitre (12) étaient des analyses condensées d'un article de synthèse (9). À cette époque, le but était de procurer les principes généraux présidant à la validation d'une épreuve. Dans ce chapitre actualisé, le contenu est réorganisé selon les différentes étapes de la validation d'une épreuve en accord avec le schéma de validation développé par l'OIE. Il met l'accent sur l'absolue nécessité de déterminer au préalable le(s) objectif(s) spécifiques pour le(s)quel(s) l'épreuve est conçue. En plus du protocole de validation proprement dit, des lignes directrices basées sur des données scientifiques sont mentionnées pour le développement, la pérennité et la généralisation des critères de validation d'une épreuve donnée.

Il faut insister sur le fait qu'une épreuve, quand elle s'applique à une population cible, minimisera les erreurs de classement d'animaux comme faux-positifs ou faux-négatifs dans la mesure où la validité est assurée à toutes les étapes du processus de validation (voir Section B. Validation des épreuves – Partie I). Cela implique que l'épreuve est bien adaptée au but pour lequel elle a été conçue (une épreuve en vue de la confirmation d'un diagnostic donnera probablement des résultats faux négatifs si elle est utilisée comme épreuve de dépistage). Il est entendu qu'une méthode de diagnostic bien conçue et documentée, ainsi que des réactifs particuliers normalisés, mise en œuvre par des techniciens bien entraînés, donnera une épreuve stable au sein du laboratoire. Ceci implique également une utilisation consciencieuse d'un concept expérimental des plus rigoureux et d'outils statistiques et épidémiologiques. Ceux-ci sont nécessaires pour réduire les biais, les erreurs aléatoires, et les fausses hypothèses concernant la population d'animaux de référence à partir de laquelle la performance des épreuves est estimée (5). Finalement, il est entendu que lorsqu'elle est mise en application, l'épreuve est effectuée dans le contexte d'un programme rigoureux d'assurance-qualité.

A. CONDITIONS PRÉALABLES INDISPENSABLES À LA VALIDATION D'UNE ÉPREUVE

1. Choix d'une épreuve adaptée à son emploi futur

La « Norme OIE » établissant les prescriptions administratives et techniques applicables aux laboratoires effectuant des analyses portant sur les maladies animales infectieuses (14)³ stipule que les méthodes d'analyse et les procédures connexes doivent être appropriées aux applications de diagnostic spécifiques afin que les résultats obtenus soient pertinents. En d'autres termes, l'épreuve doit être adaptée à « l'emploi prévu ».

Comme cela est souligné dans la rubrique « Certification des épreuves diagnostic » du site internet de l'OIE (www.oie.int), l'étape initiale est le choix d'un type d'épreuve qui puisse vraisemblablement être validé pour un emploi précis. Le(s) but(s) recherché(s) d'une épreuve peuvent être largement défini(s) et sont les suivants :

- 1) Démontrer l'absence d'infection dans une population précise (pays/zone/élevage/troupeau) (prévalence apparente nulle) :
 - 1a) « Absence » avec et/ou sans vaccination,
 - 1b) Absence historique,
 - 1c) Nouvelle absence après apparition de foyers.
- 2) Certification de l'absence d'infection ou d'un agent pathogène chez un animal individuel ou un produit à des fins de mouvements d'animaux ou de commerce,
- 3) Éradication de l'infection de populations définies,
- 4) Confirmation du diagnostic de cas suspects ou cliniques (cela inclut la confirmation d'un test de dépistage positif),
- 5) Estimation de la prévalence de l'infection ou d'exposition en vue d'une analyse de risque (enquêtes, état de santé des troupeaux, mesures de lutte contre une maladie),
- 6) Détermination du statut immunitaire (post-vaccination) d'animaux ou de populations spécifiques.

La Norme OIE stipule, en outre, que pour être considérée comme appropriée, une méthode d'analyse doit être validée correctement et que cette validation doit respecter les principes décrits dans les chapitres sur la validation de ce *Manuel terrestre*.

Bien que ce chapitre traite de la validation et de l'adaptation d'une épreuve à son emploi prévu d'un point de vue scientifique, il convient de remarquer que d'autres facteurs peuvent avoir un impact sur la pertinence d'une

3 Il s'agit là d'une interprétation spécifique des exigences générales stipulées par la Norme ISO/IEC 17025 2005 portant sur la norme de qualité internationale applicable aux laboratoires d'analyse.

épreuve en ce qui concerne cette adaptation à l'emploi prévu. Ces facteurs comprennent l'acceptabilité de l'épreuve par la communauté scientifique et les autorités de régulation, son acceptabilité par le client et sa faisabilité selon les ressources disponibles dans le laboratoire. L'incapacité d'une épreuve à remplir les conditions opérationnelles peut la rendre impropre à atteindre l'objectif pour lequel elle a été conçue. Ces conditions opérationnelles sont, entre autres, les coûts de réalisation de l'épreuve, les équipements disponibles, le niveau de compétence technique et d'expertise pour l'interprétation du personnel, la disponibilité des réactifs ou des kits, la durée de conservation, les conditions de transport des échantillons, la biosécurité et la biosûreté, les échantillons utilisés, le temps de réalisation de l'épreuve, les aspects de contrôle de qualité et d'assurance qualité.

2. Considérations initiales pour le développement d'une épreuve

Pour illustrer les principes de la validation d'une épreuve, nous prendrons pour exemple une méthode immuno-enzymatique (ELISA) indirecte appliquée à la détection d'anticorps. Ce type d'épreuve peut s'avérer difficile à valider en raison de l'amplification du signal des composants spécifiques et non spécifiques (2). Cela permet de passer en revue les problèmes qui se posent lors d'une procédure de validation d'épreuve sérologique. La validation d'autres épreuves, simples ou complexes, s'effectue selon les mêmes principes. Cependant, chaque type d'épreuve comme, par exemple, une épreuve ELISA pour la détection d'antigène, peut nécessiter d'autres conditions de collecte et de conservation des échantillons. Il est sous-entendu dans ce chapitre que la personne chargée du développement d'une épreuve aura un bon niveau d'expertise scientifique afin de préparer et de réaliser les protocoles et les réactifs en vue d'une épreuve validée qui sera publiée dans une revue scientifique à comité de lecture. Le Chapitre 1.1.5. « Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses » décrit les principes de validation des techniques d'amplification de gènes.

Pour la validation d'une épreuve, le choix d'échantillons appropriés, d'instruments bien calibrés et d'une méthodologie pertinente sont des éléments essentiels. La continuité des expériences est garantie quand les réactifs et les échantillons sont bien sélectionnés, correctement préparés, répartis en fractions aliquotes et conservés en vue d'être utilisés dans chaque expérience. Cela réduit au minimum le nombre de variables et protège contre les échecs quand la procédure de validation est initiée. Cette approche diminue la variabilité et procure les données nécessaires à l'établissement des témoins appropriés qui garantissent la validité de chaque réalisation de l'épreuve.

a) Études de faisabilité – Choix des échantillons

Des échantillons sont nécessaires pour les expériences afin de vérifier si l'épreuve proposée est réalisable. Pour cette première étape, il convient de sélectionner 4 à 5 échantillons (de sérum dans notre exemple) allant des titres les plus élevés d'anticorps vis-à-vis de l'agent infectieux concerné, aux titres les plus faibles, ainsi qu'un échantillon exempt de tout anticorps. Ces prélèvements doivent idéalement représenter des animaux infectés et non-infectés, connus, provenant de la population qui deviendra la cible une fois l'épreuve validée. Les échantillons doivent donner des résultats attendus dans une ou plusieurs épreuves sérologiques différentes de celle qui est en cours de validation. Les prélèvements proviennent de préférence, d'animaux distincts, mais ils peuvent également être composés par des groupes de sérums (pools) provenant de plusieurs animaux. Ces échantillons sont utilisés dans les expériences pour déterminer si l'épreuve est capable de distinguer des quantités variables de la substance à analyser (des anticorps dans notre exemple), pour optimiser les concentrations de réactifs et pour améliorer le protocole.

Le mieux est de préparer une grande quantité (par exemple : 10 ml ou plus si possible) de chaque échantillon et de la répartir en fractions aliquotes de 0,1 ml pour un stockage à ou en dessous de -20°C . Une fraction aliquote de chaque sérum est ensuite décongelée, utilisée pour les expériences et de manière idéale éliminée. S'il n'est pas possible d'éliminer cette fraction aliquote, elle sera conservée à 4°C entre les expériences pendant environ 2 semaines ; cependant, dans ces conditions, un risque de détérioration existe. Une autre fraction est alors mise à décongeler pour une autre expérimentation. On travaille ainsi à partir de la même source de sérums et avec le même nombre de cycles de congélation/décongélation pour toutes les expériences (une congélation et une décongélation répétées de sérum risquent de dénaturer les anticorps et doivent être évitées). De même, la variation entre les expériences est moins grande lorsque la même source de sérum est utilisée pour toutes les expériences au lieu de passer d'un sérum à l'autre entre les diverses expériences. Cette méthode présente, en outre, l'avantage de générer un ensemble d'informations pour les prélèvements soumis à des réalisations répétées de l'épreuve.

Des réalisations répétées de l'épreuve avec ces échantillons peuvent servir de base pour l'évaluation préliminaire de la capacité à la réitération dans le cadre d'une même série ou de séries différentes de l'épreuve diagnostique. Quand ils sont comparés avec les sérums étalons internationaux pour établir leur activité (concentration ou titre), un ou plusieurs de ces échantillons peuvent aussi servir d'étalons secondaires, offrant ainsi la garantie que les épreuves qui seront réalisées en série fourniront des données exactes (16).

Au final, cet ensemble de sérums étalons secondaires pourra être utilisé comme sérum témoin lors de réalisations futures de l'épreuve en série, une fois la validation de cette dernière achevée.

Il est fortement recommandé d'inclure, à une étape précoce du développement de l'épreuve, des sérums étalons internationaux de l'OIE ou d'autres sérums étalons internationaux s'ils sont disponibles. Ceci facilite une harmonisation et une meilleure comparaison entre l'épreuve en cours de développement et une épreuve diagnostic de référence pour laquelle des sérums étalons internationaux sont utilisés en routine (15).

b) Choix de la méthode pour obtenir des résultats normalisés

La normalisation consiste à ajuster les résultats bruts de l'épreuve de tous les échantillons par rapport aux valeurs des prélèvements témoins inclus dans chaque réalisation de l'épreuve (à ne pas confondre avec la transformation des données pour obtenir une distribution de Gauss dite « normale »). En général, la méthode de normalisation et d'expression des données doit être choisie au plus tard à la fin des études de faisabilité. Les comparaisons de résultats d'un jour sur l'autre et entre laboratoires sont plus exactes lorsqu'on utilise des données normalisées. Par exemple, dans les systèmes ELISA, les valeurs relatives à la densité optique brute (absorbance) sont des mesures absolues pouvant être influencées par la température ambiante, les paramètres de l'épreuve et l'appareillage photométrique. Pour tenir compte de cette variabilité, les résultats sont exprimés comme une fonction de la réactivité d'un ou de plusieurs sérums témoins inclus dans chaque épreuve réalisée. Ces données sont dites normalisées ou indexées sur les échantillons témoins. Pour normaliser les données dans l'épreuve ELISA indirecte, on exprime les valeurs d'absorbance d'une ou de plusieurs façons (16). Une méthode simple et utile consiste à exprimer toutes les valeurs de densité optique en pourcentage d'un seul sérum témoin positif, inclus dans chaque plaque (échantillon/témoin positif ou ratio S/P pour *Sample/Positive*). (Ce témoin doit donner un résultat compris dans la phase linéaire des mesures.) Cette méthode convient pour la plupart des applications. Il existe une méthode plus rigoureuse qui consiste à calculer les résultats à partir d'une courbe standard générée par plusieurs sérums témoins. Elle nécessite un algorithme plus sophistiqué comme la régression linéaire ou une analyse « log-logit ». Il s'agit là d'une approche plus précise dans la mesure où elle ne repose pas sur un seul échantillon témoin hautement positif pour la normalisation des données, mais sur plusieurs témoins sériques, ajustés en fonction des valeurs attendues, pour tracer une courbe standard à partir de laquelle la valeur de l'échantillon est extrapolée. Elle permet également d'exclure une valeur témoin pouvant se trouver en dehors des limites de l'intervalle de confiance déterminé lors du tracé de la courbe standard.

Pour des épreuves comme la neutralisation virale avec titrage en dilution limite du prélèvement, chaque réalisation est acceptée ou rejetée à partir des valeurs des témoins qui se situent ou non dans les limites préétablies. Comme les valeurs du prélèvement ne sont habituellement pas ajustées en fonction d'une valeur de référence, les données ne sont pas normalisées au sens strict du terme.

Qu'elle que soit la méthode utilisée pour la normalisation des données, il est essentiel de prévoir des témoins supplémentaires pour un réactif pouvant introduire une variabilité et, partant, compromettre les efforts visant à obtenir une épreuve validée. Les valeurs normalisées de ces échantillons témoins doivent se situer dans les limites prédéterminées (par exemple : écart type de ± 2 ou ± 3 par rapport à la moyenne d'un grand nombre d'épreuves de chaque échantillon témoin). Les limites déterminées doivent refléter un taux de rejet des épreuves qui soit raisonnable et acceptable, mais également présenter un risque acceptable qu'un certain nombre d'échantillons soient inclassables.

B. VALIDATION DE L'ÉPREUVE – PREMIÈRE ÉTAPE

1. Optimisation et normalisation des réactifs

En utilisant plusieurs sérums connus tels que des sérums étalons internes au laboratoire (voir la Section A.2.a de ce Chapitre) ou des sérums étalons en provenance d'autres laboratoires, les dilutions/concentrations optimales sont déterminées pour l'antigène adsorbé sur la plaque, pour les sérums, pour le conjugué marqué à l'enzyme et pour la solution de substrat, selon un titrage en « échiquier » de chaque réactif vis-à-vis de tous les autres réactifs ; auparavant, le choix du support de la réaction aura été confirmé (en général, évaluation de 2 ou 3 types de plaques de micro-titrage, chacune avec ses propres caractéristiques de sensibilisation afin de réduire le bruit de fond tout en obtenant la plus grande fourchette possible entre les échantillons négatifs et positifs). Des expérimentations supplémentaires déterminent les variables chimiques, physiques et temporelles pour le protocole notamment les températures et les durées d'incubation, le type de diluant et son pH, les tampons de lavage et de blocage et l'équipement utilisé à chaque étape de l'épreuve (par exemple, des pipettes et les flacons de lavage qui donnent la meilleure reproductibilité).

Le choix des réactifs et leur caractérisation doit faire l'objet d'une étude approfondie au risque de compromettre l'évaluation des performances de l'épreuve. Ainsi, la spécificité de l'épreuve peut-elle être augmentée grâce à des antigènes recombinés ou grâce à des anticorps monoclonaux dans les épreuves de capture ou les épreuves de compétition. En revanche, la méthode de production des réactifs peut conduire à une spécificité réduite et une plus grande variabilité. Ainsi par exemple, si l'antigène viral utilisé dans l'épreuve est obtenu sur le même système de culture qui est utilisé pour la production d'un vaccin généralement employé sur l'espèce ciblée par l'épreuve, des réactions non spécifiques peuvent apparaître. Il est donc nécessaire de réaliser une absorption des antigènes non spécifiques présents aussi bien dans le vaccin que dans l'antigène de l'épreuve, ou de tester un témoin de la culture cellulaire contre chaque sérum échantillon lors d'épreuves de routine, afin d'identifier et d'estimer l'importance de ces réactions croisées. Lors du choix d'un réactif, il est évident que l'anticipation de ses effets positifs ou négatifs sur le développement et la validation de l'épreuve doit être une préoccupation majeure ; de minutieuses expérimentations sont nécessaires pour optimiser l'épreuve.

Quand un réactif (comme les témoins) arrive à épuisement, il est essentiel de préparer et de tester plusieurs fois un réactif de remplacement avant l'épuisement total du réactif. Le nouveau témoin préparé est inclus dans 10 à 20 réalisations de l'épreuve avant l'épuisement du témoin d'origine afin d'établir une relation quantifiée avec le précédent témoin. Si le témoin épuisé est un témoin positif pour un ELISA dans lequel la valeur normalisée est exprimée en pourcentage du témoin positif, la différence proportionnelle de son activité dans l'ELISA doit être factorisée dans l'algorithme de normalisation afin de retenir le même seuil de coupure et, par voie de conséquence, la même SeD et la même SpD pour l'épreuve. Quand d'autres réactifs, comme l'antigène de capture des anticorps, doivent être remplacés, ils doivent être produits selon les mêmes critères que les réactifs d'origine, et testés au moins 5 fois dans l'épreuve avec des sérums qui ont été conçus dans ce but. Les lots de réactifs (séries) doivent être évalués pour la cohérence afin de réduire la variabilité de l'épreuve lorsque de nouveaux lots sont nécessaires. À chaque fois que cela est possible, il est important de changer un seul réactif à la fois afin d'éviter le souci d'évaluer plus d'une variable à la fois. La variabilité est réduite au minimum quand les réactifs sont bien caractérisés selon d'autres méthodes que celles de l'épreuve en cours de validation.

a) Limites opérationnelles linéaires de l'épreuve

La gamme des valeurs qui définit les limites linéaires opérationnelles d'une épreuve est déterminée par des dilutions en série au cours desquelles un sérum fortement positif est dilué en série dans un sérum négatif. Chaque dilution est soumise au test à la dilution de travail optimale dans un tampon, et le graphique des résultats dresse « la courbe des réponses ». Cette courbe, aussi appelée parfois la « courbe dose-réponse » comme en pharmacologie, établit la gamme linéaire des valeurs de l'épreuve qui sont valides lors de l'utilisation de l'épreuve.

b) Calibrage en fonction des réactifs de référence

i) Étalons internationaux

Les sérums étalons et les autres réactifs, disponibles auprès de l'OIE, l'OMS, la FAO ou d'autres organisations internationales, peuvent être utilisés pour harmoniser l'épreuve sur la base des résultats moyens obtenus avec les réactifs de référence dont l'activité est connue.

ii) Étalons préparés au laboratoire

Les sérums préparés au laboratoire pour être utilisés comme sérum témoin (utilisés pour la normalisation des données) et les sérums de deuxième génération, tels que les sérums faiblement positifs, fortement positifs et négatifs (utilisés pour estimer la capacité de réitération dans des épreuves ultérieures de routine), peuvent être calibrés sur la courbe de réponse pour obtenir des valeurs moyennes pour chaque sérum.

2. Répétabilité (Capacité de réitération)

Une mise en évidence préliminaire de la capacité à la réitération (accord entre des échantillons analysés en parallèle lors d'une même épreuve ou de la répétition de l'épreuve dans le temps) est indispensable pour justifier un développement ultérieur de l'épreuve. Pour ce faire, on évalue les résultats d'au moins 3 échantillons préparés au laboratoire représentant l'activité dans la gamme linéaire de l'épreuve. Quatre répliques de ces échantillons sont testées dans au moins 4 réalisations de l'épreuve dans une même plaque pour déterminer la variation intraplaque. La variation entre les réalisations de l'épreuve (variation interplaques) est déterminée en testant le même échantillon au cours de 20 réalisations de l'épreuve au moins, réalisés par 2 (ou plus) opérateurs, et de préférence à des jours différents. Toutes les réalisations doivent être indépendantes les unes des autres.

Pour l'épreuve ELISA, on a normalement recours, à ce stade de la validation, à des valeurs d'absorbance brutes pour la capacité de réitération car on ignore si les résultats du sérum témoin nettement positif pouvant être utilisés pour calculer des valeurs normalisées, sont reproductibles dès les premières étapes de l'épreuve. Par ailleurs, les valeurs moyennes provenant de réalisations répétées sur chaque témoin n'ont pas encore été

établies. Des coefficients de variation (CV : écart-type des répliques divisé par la moyenne des répliques), généralement inférieurs à 20 % pour les valeurs d'absorbance brutes de la plupart des échantillons (les échantillons de faible titre peuvent avoir des CVs plus importants), indiquent une capacité à la réitération adéquate à ce stade du développement de l'épreuve. Toutefois, si la plupart des échantillons, lors d'une même série ou de séries différentes du test, donnent des signes évidents de variation excessive (> 30 %), des études préliminaires supplémentaires doivent être effectuées pour savoir si une stabilisation de l'épreuve est possible ou si ce type d'épreuve doit être abandonné. Il s'agit là d'un point important car une épreuve dont la variabilité inhérente est importante risque fort de ne pas résister à des usages quotidiens sur des prélèvements issus de la population animale cible.

D'autres preuves de la capacité de réitération sont obtenues au cours des nombreuses réalisations de l'épreuve dans les étapes ultérieures du processus de validation complète de l'épreuve. Cela est réalisé en testant des répliques de chaque témoin et des échantillons au cours des expériences conduites en vue d'établir d'autres paramètres de validation (voir Section C. Validation de l'épreuve – Partie 2, ci-dessous). Ces données confirmeront les estimations de la capacité de réitération car elles seront basées sur les résultats des tests de variation intra- et inter-plaques avec des réactifs préparés au jour le jour (cela inclut l'utilisation de différents lots de réactifs qui pourrait affecter la capacité de réitération).

3. Détermination de la sensibilité et de la spécificité analytiques

La spécificité analytique désigne l'aptitude de l'épreuve à ne pas présenter de réaction croisée avec d'autres substances et la sensibilité analytique d'une épreuve désigne la quantité minimale de la substance à analyser pouvant être décelée, c'est-à-dire la limite inférieure de l'épreuve.

Pour évaluer la spécificité analytique, on a recours à une série de sérums provenant d'animaux qui ont eu des infections apparentées (cliniquement ou du fait d'agents pathogènes proche génétiquement) susceptibles de stimuler des anticorps montrant une réactivité croisée. Cette étude des résultats avec des sujets d'analyse apparentés est utile pour estimer la probabilité de réactions faussement positives obtenues avec l'épreuve. Elle convient aussi pour établir un critère de spécificité de groupe, qui comprend la détection de la substance à analyser dans le sérum d'un animal qui a été exposé à - ou infecté par des micro-organismes appartenant à un groupe ou à un sérotype d'intérêt. Il est important aussi d'évaluer la spécificité analytique de l'épreuve sur des échantillons provenant d'animaux vaccinés. Si les anticorps induits par un virus constituent la cible de l'épreuve, la vaccination contre ce virus peut entraîner des anticorps interférant avec la capacité de l'épreuve à détecter une infection. De même, si l'antigène viral utilisé dans l'épreuve est obtenu à partir d'une culture de cellules, contenant d'autres antigènes (protéines présentatrices) que le virus, un animal vacciné peut se révéler faux-positif, du fait de la réaction avec des anticorps qui ne sont pas dirigés contre le virus.

La sensibilité analytique d'une épreuve peut être estimée en quantifiant la plus faible quantité de la substance à analyser détectable dans un échantillon. Cela peut se faire en évaluant la dilution limite de la substance à analyser dont la concentration est connue. Toutefois, l'absence de tels échantillons ou étalons (dont la concentration ou l'activité est connue) rend une telle mesure objective souvent impossible à obtenir. Une autre approche consiste à utiliser l'analyse des dilutions finales d'échantillons provenant d'animaux connus pour être positifs, afin d'estimer la pénultième dilution à laquelle la substance à analyser n'est plus détectable ou dont l'activité est semblable à celle d'un sérum négatif. Lorsque l'épreuve en cours de validation est réalisée parallèlement avec d'autres épreuves sur les mêmes échantillons, il est possible d'estimer une mesure relative de la sensibilité analytique.

Outre les sujets d'analyse de référence ou les échantillons pour lesquels les titres ont été déterminés à l'aide d'autres épreuves, il est possible de créer des échantillons en incorporant une quantité connue de la substance à analyser dans un échantillon négatif. Cependant, dans ce cas, ces échantillons peuvent être intrinsèquement différents des échantillons cliniques avec le risque d'entraîner des conclusions inexactes.

Si l'objectif de l'épreuve est de dépister les animaux sur la base d'une réaction sérologique, la sensibilité analytique doit être élevée afin d'obtenir la plus grande probabilité possible de détecter des animaux infectés. S'il n'est pas possible d'obtenir une très grande sensibilité analytique, l'épreuve peut ne pas convenir pour le dépistage. En revanche, si l'objectif de l'épreuve est la confirmation du résultat d'une autre méthode de diagnostic, l'important est la spécificité analytique afin de réduire au maximum les réactions croisées. Si aucun de ces objectifs n'est réalisable, les réactifs doivent être recalibrés ou remplacés, ou l'épreuve doit être abandonnée.

C. VALIDATION DE L'ÉPREUVE – SECONDE ÉTAPE

1. Détermination des performances diagnostiques de l'épreuve après établissement d'un protocole normalisé de l'épreuve et des critères que doivent remplir les réactifs

Les estimations de la SeD et de la SpD figurent parmi les principaux paramètres établis au cours de la validation d'une épreuve. Elles doivent être déterminées après que l'épreuve et les réactifs aient été optimisés et normalisés ; il peut être nécessaire de déterminer à nouveau ces caractéristiques après une modification du protocole ou des réactifs. Elles constituent une base pour le calcul d'autres paramètres permettant de réaliser des déductions à partir des résultats de l'épreuve. Il est impératif de définir le plus précisément possible la SeD et la SpD. Idéalement, elles doivent découler de tests effectués sur une série d'échantillons de référence provenant d'animaux de référence dont l'historique et le statut infectieux sont connus pour la maladie ou l'infection concernée et être pertinentes par rapport au pays ou à la région où l'épreuve sera utilisée ; toutefois, cela n'est pas toujours possible. Un programme d'échantillonnage doit être établi afin de permettre une estimation des performances diagnostiques de l'épreuve. Cependant cette opération est souvent difficile et compliquée du fait de contraintes logistiques et financières. Une autre contrainte tient au fait que des populations de référence ou une épreuve de référence (gold standard) peuvent faire défaut. Ci-dessous sont indiqués des exemples de populations de référence et de méthodologies qui peuvent aider à la détermination des performances diagnostiques de l'épreuve en cours de validation.

a) Populations animales de référence

i) *Animaux de référence infectés/exposés et animaux de référence non infectés/non exposés*

La sélection d'animaux de référence pour évaluer les performances nécessite que les variables attribuées à la population cible soient présentes dans les populations d'animaux de référence infectés/exposés et non infectés/non exposés. Ces variables sont entre autres : l'espèce, l'âge, le sexe, la race, l'état nutritionnel, la gestation, le stage de l'infection, le statut immunologique (qui comprend l'historique de la vaccination) et les données historiques, épidémiologiques et cliniques sur les maladies du troupeau.

ii) *Statut d'animal de référence établi par d'autres épreuves*

En sérologie, « l'épreuve de référence pour la comparaison » est une méthode (ou une association de méthodes) à laquelle la nouvelle épreuve est comparée. Bien que le terme de « gold standard » soit couramment utilisé pour nommer ce type de méthode, il devrait être réservé aux seules méthodes qui classent de façon univoque les animaux en infectés ou exposés d'une part et non infectés d'autre part. Certaines méthodes d'isolement ont elles aussi des problèmes de répétabilité et de sensibilité. Les méthodes « gold standard » comprennent l'isolement univoque de l'agent pathogène ou des critères histopathologiques/pathogénomique.

En raison de l'absence possible d'un « gold standard » ou de l'impossibilité de le mettre en œuvre, des épreuves de référence relatives pour la comparaison sont souvent nécessaires : les plus fréquemment utilisés sont d'autres épreuves de sérologie. Le calcul de la SeD et de la SpD est plus fiable si le « gold standard » existe. Quand seulement des épreuves de référence relatives pour la comparaison sont disponibles, les estimations de la SeD et de la SpD pour ce qui de la nouvelle épreuve peuvent être compromises : les erreurs d'estimation de la SeD et de la SpD commises pour les épreuves de référence relatives étant reportées sur les estimations de la nouvelle épreuve. En fait, lorsque l'on utilise des méthodes de référence imparfaits sans faire l'effort de supprimer les biais, les estimations de la SeD et de la SpD sont forcément faussées et, par conséquent, inacceptables.

iii) *Animaux de référence expérimentalement infectés ou vaccinés*

Des sérums prélevés à intervalles réguliers sur des animaux expérimentalement infectés ou vaccinés ont été utilisés pour « valider » une nouvelle épreuve. De telles observations, avant et après conversion sérologique, à partir des mêmes animaux ne sont pas acceptables pour l'estimation de la SeD et de la SpD car le principe statistique qui exige des observations indépendantes n'est pas respecté. Il convient donc de ne faire qu'une fois les prélèvements sur les animaux d'expérience. Par ailleurs, l'exposition expérimentale à des agents pathogènes ou la vaccination peuvent induire des réponses en anticorps qui ne sont pas caractéristiques aux plans quantitatif et qualitatif de la réponse naturelle à l'infection de la population cible (9). La souche de l'agent pathogène, la dose et le mode d'administration aux animaux d'expérience sont autant de variables qui peuvent introduire des erreurs lors de l'extrapolation des estimations de la SeD et de la SpD à la population cible. Pour ces raisons, il est préférable que la validation d'une épreuve ne soit basée seulement sur des animaux d'expérience.

iv) *Animaux de référence dont le statut est inconnu*

Lorsqu'il est impossible de collecter des sérums à partir d'animaux dont le statut vis-à-vis de l'infection est connu, il est possible d'estimer la SeD et la SpD par des méthodes qui ne sont pas des « gold standard » ou par des modèles statistiques de classe latente (3, 7). Du fait de la complexité de ces

modèles statistiques, il convient de consulter un expert pour des conseils sur le protocole et les méthodes de collecte des prélèvements à partir de la (ou des) population(s) cible(s), sur les caractéristiques des autres épreuves incluses dans l'analyse, sur le choix du modèle approprié et sur les méthodes d'estimation basées sur la littérature scientifique.

2. Détermination du seuil de coupure

Pour parvenir à estimer la SeD et la SpD de la nouvelle épreuve, les résultats d'une série de réalisation de l'épreuve doivent être réduits à des catégories positives ou négatives. L'insertion d'un point limite de positivité (seuil ou limite de décision) sur l'échelle continue des résultats de l'épreuve permet de catégoriser les différents échantillons. Même si de nombreuses méthodes ont été décrites à cette fin, nous prendrons 3 exemples pour illustrer différentes approches avec leurs avantages et leurs inconvénients. La première méthode permet de déterminer un seuil de coupure de base fondé sur les distributions de fréquence (9) des résultats d'épreuves opérés à partir d'échantillons provenant d'animaux de référence non infectés ou infectés. Ce seuil peut être établi par un examen visuel direct des distributions de fréquence, par une analyse des caractéristiques receveur-opérateur (ROC) (6, 17), ou par la sélection d'une valeur améliorant la SeD et la SpD en fonction de l'utilisation souhaitée pour une épreuve donnée (11). Une seconde méthode consiste à établir un seuil de coupure fondé uniquement sur des animaux de référence non infectés, dans le cas présent le 99^e centile dans une fréquence de distribution de valeurs de l'épreuve pour des animaux de références non-infectés ; on peut ainsi estimer la SpD, mais pas la SeD. La 3^e méthode permet de calculer un seuil de coupure intrinsèque, basé sur les résultats obtenus à partir de sérums prélevés de manière aléatoire au sein de la population cible, sans connaissance préalable du statut infectieux des animaux donneurs (4).

En cas de chevauchement important dans les distributions de valeurs de l'épreuve provenant d'animaux infectés et non infectés connus, il est difficile de sélectionner un seuil de coupure permettant de déterminer avec précision le statut infectieux des animaux. Au lieu d'un seuil de coupure unique, deux seuils peuvent être sélectionnés. Le premier permet de définir une SeD élevée (par exemple : 99 % des sérums de référence provenant d'animaux infectés donnent des résultats au-dessus du seuil de coupure), et le second détermine une SpD élevée (par exemple : 99 % des sérums de référence provenant d'animaux non infectés donnent des résultats au dessous du seuil de coupure). Les valeurs qui se situent entre ces deux seuils seront dès lors qualifiées de douteuses ou d'équivoques et nécessiteront une épreuve de confirmation ou une nouvelle analyse de l'animal à une date ultérieure pour détecter une séroconversion éventuelle.

La valeur du seuil de coupure retenue dépend de l'objectif pour lequel l'épreuve est conçue. Par exemple, une épreuve de dépistage avec une SeD élevée comparée à une épreuve de confirmation avec une SpD élevée nécessiteront des seuils de coupure différents dans le même système d'épreuve. Même si le seuil de coupure est dicté par l'objectif pour lequel l'épreuve est conçue, une analyse ROC est néanmoins souhaitable car elle mettra en évidence les performances de l'épreuve dans d'autres contextes épidémiologique.

3. Estimations des performances de l'épreuve

a) Nombre des animaux de référence nécessaire

Le nombre et l'origine des échantillons de référence associés à la méthodologie employée pour estimer la SeD et la SpD sont d'une importance considérable si l'épreuve doit être validée pour être utilisée dans la population cible. Il est possible de calculer le nombre d'échantillons de référence provenant d'animaux au statut infection/exposition connu, pour le calcul de la SeD et de la SpD, dans des limites statistiquement définies. Les formules mathématiques et les tableaux pour déterminer le nombre d'échantillons nécessaires sont donnés dans la bibliographie (5, 9). Le tableau 1, page 474, de la référence 9 montre combien le nombre d'échantillons testés modifie le niveau de confiance dans le calcul des estimations de la SeD et de la SpD. Ainsi, par exemple, pour estimer une SeD ou SpD de 92 % avec un seuil de confiance de 75 % il faut 161 animaux positifs (infectés connus) à partir de la population ciblée par l'épreuve (avec un risque d'erreur de ± 2 %). Cependant, pour augmenter le seuil de confiance à 95 %, 542 animaux/échantillons sont nécessaires. Le nombre d'échantillons théoriquement nécessaires pour obtenir un niveau de confiance allant de 75 à 99 %, pour des épreuves dont la SeD et la SpD prévues se situent entre 80 % et 99 %, peut être retrouvé dans le tableau de cette référence.

b) Estimations de la SeD et de la SpD sur la base d'animaux de référence au statut infectieux défini

La sélection d'un seuil de coupure permet de classer les résultats des épreuves en deux catégories : résultats positifs ou négatifs. Les calculs des SeD et SpD sont facilités en alignant les données des catégories positives/négatives avec celles concernant l'état sanitaire connu de chaque animal (méthode de comparaison) dans un tableau à deux entrées (Tableau 1). Une fois le seuil de coupure établi, les résultats des épreuves effectués sur les sérums de référence peuvent être classés en deux catégories : les vrais positifs (VP) et les vrais négatifs (VN). Ces désignations montrent l'accord parfait entre les résultats

provenant de la méthode en cours de validation et ceux opérés avec la méthode de référence (ou une autre méthode permettant une comparaison). En revanche, les résultats des sérums de référence classés dans les catégories faux-positifs (FP) ou faux-négatifs (FN) témoignent de l'existence d'un désaccord avec la méthode de référence. La sensibilité diagnostique est calculée selon la formule $(VP)/(VP+FN)$ alors que la spécificité diagnostique se calcule selon la formule $(VN)/(VN+FP)$. Les résultats de ces deux types de calculs sont habituellement exprimés en pourcentages (Tableau 1).

Tableau 1. Calcul de SeD et SpD grâce à un tableau à deux entrées associant le statut sanitaire avec les résultats des épreuves provenant de 2 000 animaux de référence.

		Animaux de référence d'un statut sanitaire connu	
		Infectés (n=600)	Non infectés (n=1 400)
résultat de l'épreuve	Positif	570	46
	Négatif	30	1 354
		VP	FP
		FN	VN
		Sensibilité diagnostique	Spécificité diagnostique
		$\frac{VP}{VP + FN} = \frac{570}{600} = 95,0\%$	$\frac{VN}{VN + FP} = \frac{1354}{1400} = 96,7\%$

c) Estimations de la SeD et de la SpD sur la base d'animaux au statut infectieux inconnu

La SeD et la SpD peuvent être estimées quand le statut infectieux des animaux n'est pas connu ; cependant ces modèles statistiques de classe latente sont complexes. Il convient de rechercher les avis d'un spécialiste non seulement pour la conception de l'évaluation mais aussi pour l'interprétation des résultats des estimations de la SeD et de la SpD. Une recommandation a été faite à l'OIE pour que soit constitué un groupe d'experts pour traiter la question des modèles statistiques de classe latente et pour rédiger des lignes directrices pour l'emploi de ces modèles dans le cadre de la validation et la certification d'épreuves par l'OIE.

4. Comparaison et harmonisation des épreuves

En général, les nouvelles épreuves sont mises au point pour améliorer les techniques existantes. Pour démontrer que la nouvelle technique est meilleure que la technique existante, il faut pouvoir les comparer. La comparaison peut porter sur les performances analytique et/ou diagnostique ; elle peut aussi porter sur les caractéristiques opérationnelles comme le coût, la robustesse, le temps de réalisation de l'épreuve, le volume traité, etc. Si la nouvelle épreuve doit être incorporée dans un système de diagnostic comprenant d'autres méthodes, les raisons de son emploi, l'interprétation des résultats et les bases de la décision doivent être précisées.

Lorsqu'une méthode de référence internationale (15) est disponible pour la détection de la substance à analyser, il est possible d'harmoniser l'efficacité de cette méthode avec celle en cours de développement. Cette procédure nécessite l'utilisation des mêmes sérums témoins et/ou de référence dans les deux épreuves. Si des sérums de référence internationaux de l'OIE ou d'autres sérums de référence internationaux sont disponibles, de préférence au moins 3 sérums (un sérum négatif, un faiblement positif et un fortement positif), ils doivent être inclus dans l'étude de comparaison des méthodes. Ceci peut conduire à la mise en place d'une nouvelle épreuve qui est indexée à une méthode de référence internationale et à des sérums de référence internationaux (15). L'harmonisation des deux méthodes peut ensuite être effectuée.

Il est essentiel que tous les échantillons, les réactifs, le protocole et les instructions pour réaliser l'épreuve soient parfaitement contrôlés. Si les réactifs n'ont pas tous la même origine, les laboratoires doivent les produire et les caractériser de façon indépendante. Cela permet d'évaluer l'adéquation du protocole pour la production et la caractérisation des réactifs. Cela fournit aussi les renseignements nécessaires pour déterminer s'il convient de créer et de partager une source unique de réactifs bien caractérisés. Une partie de l'évaluation consiste à vérifier que le protocole ou les instructions d'utilisation sont complètes, claires et précises. Si des instructions orales sont indispensables, le développeur devrait envisager la révision du protocole afin qu'il soit complet. S'il apparaît que le protocole (ou les instructions) a été interprété de différentes manières, il devrait alors être écrit à nouveau et la reproductibilité devrait être ré-établie sur la base du protocole (ou des instructions) révisé.

D. VALIDATION DE L'ÉPREUVE – TROISIÈME ÉTAPE

1. Établir la reproductibilité et améliorer les estimations de la répétabilité

Une épreuve prévue pour être distribuée à de nombreux laboratoires (comme par exemple les kits commerciaux) doit être évaluée quant à sa reproductibilité, qui est la capacité d'une méthode à fournir des résultats consistants quand elle est appliquée à des fractions aliquotes des mêmes échantillons testées dans différents laboratoires. Cela consiste à tester un panel de sérums dans au moins 3 laboratoires utilisant la même méthode et le même panel de sérums.

Un panel test comprend au minimum 20 échantillons réunis à cette fin. Idéalement, ces échantillons seront des échantillons individuels provenant d'animaux pris dans la population cible et représentatifs de la gamme d'activité de l'épreuve telle qu'elle peut être prévue. Si de tels échantillons ne sont pas disponibles, des dilutions des sérums fortement positifs dans des sérums négatifs permettront d'obtenir une gamme d'activité acceptable mais pas optimale. Il est souhaitable de réaliser des doubles d'au moins 20 % des sérums afin de vérifier la répétabilité dans chacun des laboratoires participants. Des fractions aliquotes de chaque échantillon sont réalisées afin de préparer des séries identiques pour chaque panel à distribuer dans d'autres laboratoires. L'identité de l'échantillon est codée pour permettre des tests en aveugle et chaque panel est manipulé, transporté dans les laboratoires participants et conservé de manière identique.

Les statistiques descriptives sur les données des tests fournies par les laboratoires comprennent la moyenne entre laboratoires, l'écart-type et les limites des résultats pour chaque échantillon ainsi que pour les témoins. L'estimation de la précision et de l'exactitude dans chaque laboratoire est facilitée par l'utilisation des points de Youden. Les données permettront de vérifier l'exactitude des limites supérieure et inférieure de l'épreuve établies par le développeur.

En outre, quand un panel d'échantillons est testé dans chaque laboratoire, il est conseillé de tester chaque échantillon en double ou en triple. Cela offre une base pour une analyse approfondie de la répétabilité au sein de chaque laboratoire qui utilise l'épreuve. De même, quand l'épreuve devient un test de routine, la répétabilité est aussi suivie par l'inclusion de témoins traités en double, et de préférence, pour chaque échantillon également.

E. VALIDATION DE L'ÉPREUVE – QUATRIÈME ÉTAPE

1. Application du programme

La preuve ultime de l'utilité de l'épreuve est son utilisation avec succès pour le ou les emplois définis. Celles-ci comprennent des programmes nationaux, régionaux et internationaux. Comme de nouvelles épreuves améliorées sont développées puis utilisées, elles remplaceront à la fin les épreuves existantes si elles apportent la preuve qu'elles sont mieux adaptées à l'emploi prévu. Cependant, cela n'arrivera que si elles deviennent des tests de routine et si leur utilité est bien documentée sur le long terme. Du fait de l'évolution normale vers l'amélioration des diagnostics et/ou des technologies, de nouvelles épreuves vont devenir les nouvelles épreuves de référence pour la comparaison. Elles obtiennent alors une reconnaissance au niveau national, régional puis international. Une fois reconnues comme référence, ces épreuves seront aussi utilisées pour développer des réactifs de référence à des fins de contrôle de qualité, pour l'organisation de tests de compétence et pour l'harmonisation. Ces réactifs de référence peuvent aussi devenir des réactifs de référence internationale. La dernière étape de la validation dans le Registre de l'OIE comprend la documentation qui traite de l'application et du degré de reconnaissance de l'épreuve en question. Ceci a pour but de fournir aux utilisateurs potentiels des informations documentées et non biaisées.

2. Suivi de la validité des performances de l'épreuve

a) Interprétation des résultats de l'épreuve – facteurs affectant la validité de l'épreuve

Les résultats de l'épreuve n'ont d'intérêt que si les conclusions qui sont déduites sont exactes. L'erreur la plus répandue est de supposer qu'une épreuve présentant 99 % de SeD et 99 % de SpD générera un résultat faussement positif et un résultat faussement négatif pour 100 tests effectués sur des animaux de la population cible. L'épreuve peut être précise et exacte tout en produisant des résultats qui ne permettent pas de prévoir avec exactitude le statut infectieux des animaux éprouvés. Ainsi, si la prévalence d'une maladie dans une population cible est de 1 pour 1 000 animaux et que le taux de faux positifs est de 1 pour 100 animaux (99 % de SpD), on obtiendra pour 1 000 tests effectués sur cette population 10 faux positifs et 1 vrai positif (si la SeD est supérieure à 50 %). Par conséquent, 9 % seulement des résultats positifs indiqueront avec exactitude le statut infectieux de l'animal ; le résultat positif de l'épreuve générera une

erreur de classement de l'animal dans 91 % des cas. Cet exemple montre qu'une valeur prédictive positive n'est pas directement corrélée à la SpD, mais qu'elle est plutôt une fonction de la prévalence de l'infection dans la population cible (10). Naturellement cette prévalence aura probablement été déterminée par une épreuve sérologique avec ces propres erreurs de classement des résultats.

Une estimation de la prévalence dans la population cible est nécessaire pour le calcul des valeurs prédictives des résultats positifs (PV+) ou négatifs (PV-). Quand les valeurs de l'épreuve sont enregistrées sans fournir les sensibilités et spécificités estimées de l'épreuve, il n'est pas possible de réaliser des prédictions valides sur le statut sanitaire à partir des résultats (9). Il est cependant hautement désirable de fournir une interprétation sur le statut sanitaire à partir des résultats de l'épreuve en indiquant sous forme d'une table les valeurs PV+ et PV- pour un intervalle de prévalences attendu de l'infection dans la population cible. Si les résultats de l'épreuve ne permettent pas de fournir cette interprétation et ne permettent pas de déterminer avec précision le statut sanitaire des animaux, l'épreuve peut être considérée comme incomplètement validée.

b) Maintient des critères de validation

Pour garantir la validité des résultats et conserver la désignation d'«épreuve validée», la surveillance, le suivi et l'amélioration continus de l'épreuve s'imposent. Une fois l'épreuve utilisée en routine, un contrôle qualité interne est utilisé pour permettre de vérifier l'épreuve quant à sa précision et son exactitude (1).

La reproductibilité des données de l'épreuve entre laboratoires doit être évaluée au moins deux fois par an. Il est fortement souhaité, à cet égard, de constituer un réseau de laboratoires intéressés par l'évaluation de leurs résultats. À court terme, de bonnes pratiques de laboratoire comportant la mise en œuvre d'un programme d'assurance qualité totale seront indispensables pour les laboratoires désireux d'obtenir l'accréditation sur le plan national ou international (se reporter au Chapitre 1.1.3., « Gestion de la qualité dans les laboratoires de diagnostic vétérinaire »).

L'évaluation des compétences est une forme de contrôle de qualité externe pour une épreuve diagnostique. Elle est habituellement confiée à un laboratoire de référence qui distribue des séries de prélèvements, reçoit les résultats des laboratoires, analyse les données et adresse un rapport sur les résultats aux laboratoires participants. Si les résultats d'un laboratoire restent dans des limites acceptables indiquant qu'il réunit les conditions d'exactitude et de reproductibilité requises, ce laboratoire peut être accrédité par des organismes publics ou des laboratoires de référence comme laboratoire officiel pour ce type d'épreuve (13). Les séries de sérums utilisées pour l'évaluation des compétences doivent représenter l'étendue des concentrations de la substance à analyser que l'on retrouve dans la population cible. Si ces séries ne comportent que des sérums aux valeurs fortement positives et faiblement positives (et aucun sérum dont les valeurs soient proches du seuil de coupure de l'épreuve), l'exercice prouvera uniquement la reproductibilité de l'épreuve aux limites extrêmes de la concentration de la substance à analyser, et ne permettra pas de savoir si les résultats de l'épreuve en utilisation courante sur la population cible aboutissent à un bon classement des animaux selon leur statut infectieux.

c) Amélioration et extension des critères de validation

Compte tenu du nombre important de variables pouvant affecter la réalisation d'épreuves de diagnostic sérologique, il est fortement conseillé d'augmenter, le plus possible, le nombre des sérums de référence provenant d'animaux ayant un statut sanitaire connu en utilisant le principe que plus la taille de l'échantillon est importante, plus la confiance concernant les estimations de la SeD et la SpD est élevée. De plus, lorsque l'épreuve doit être appliquée dans une zone géographique complètement différente, il est indispensable de valider l'épreuve pour cette nouvelle utilisation, en utilisant des sérums prélevés dans la population locale. Il en va de même pour établir la SeD et la SpD pour les sous-populations (ex : groupes d'âge, vaccinés/non vaccinés, etc.).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. CEMBROWSKI G.S. & SULLIVAN A.M. (1992). Quality control and statistics. *In: An Introduction to Clinical Chemistry*, Bishop M.L., Duben-Engelkirk J.L. & Fody E.P., eds. Lippincott, Philadelphia, USA, 63–101.
2. CROWTHER J.R. (1995). ELISA theory and practice. *In: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 1–256.
3. ENOE C., GEORGIADIS M.P. & JOHNSON W.O. (2000). Estimating the sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Prev. Vet. Med.*, **45**, 61–81.

4. GREINER M., FRANKE C.R., BOHNING D. & SCHLATTMANN P. (1994). Construction of an intrinsic cut-off value for the sero-epidemiological study of *Trypanosoma evansi* infections in a canine population in Brazil: a new approach towards unbiased estimation of prevalence. *Acta Trop.*, **56**, 97–109.
5. GREINER M. & GARDNER I. (2000). Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Vet. Prev. Med.*, **45**, 3–22.
6. GREINER M., PFEIFFER D. & SMITH R.D. (2000). Principles and practical application of the receiver operating characteristic (ROC) analysis for diagnostic tests. *Vet. Prev. Med.*, **45**, 23–41.
7. HUI S.L. & WALTER S.D. (1980). Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics*, **36**, 167–171.
8. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION/INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION (ISO/IEC) (2005). ISO/IEC 17025:2005, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
9. JACOBSON R.H. (1998). Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17**, 469–486.
10. JACOBSON R.H. (1991). How well do serodiagnostic tests predict the infection of disease status of cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **199**, 1343–1347.
11. SMITH R.D. (1991). Clinical Veterinary Epidemiology. Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA, USA, 1–223.
12. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (1996). Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *In: OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Third Edition*. OIE, Paris, France, 8–15.
13. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2002). OIE Guide 3: Laboratory Proficiency Testing. *In: OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases*. OIE, Paris, France, 53–63.
14. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2002). OIE Standard for Management and Technical Requirements for Laboratories Conducting Tests for Infectious Diseases. *In: OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases*. OIE, Paris, France, 1–31.
15. WRIGHT P.F. (1998). International standards for test methods and reference sera for diagnostic tests for antibody detection. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17**, 527–533.
16. WRIGHT P.F., NILSSON E., VAN ROOIJ E.M.A., LELENTA M. & JEGGO M.H. (1993). Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12**, 435–450.
17. ZWEIG M.H. & CAMPBELL G. (1993). Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.*, **39**, 561–577.

*
* *

VALIDATION ET CONTRÔLE QUALITÉ DES MÉTHODES D'AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRASE (PCR) UTILISÉES POUR LE DIAGNOSTIC DES MALADIES INFECTIEUSES

INTRODUCTION

Le diagnostic de maladies infectieuses est réalisé par la détection directe et/ou indirecte d'agents infectieux. Par les méthodes directes, les particules des agents et/ou leurs composants, tels que les acides nucléiques, les protéines structurales ou non-structurales, les enzymes, etc., sont détectés. Les méthodes indirectes démontrent la présence des anticorps induits par les infections.

Les méthodes les plus usuelles pour la détection directe sont l'isolement ou la culture in vitro, la microscopie électronique, l'immunofluorescence, l'immunohistochimie, les épreuves immuno-enzymatiques (ELISA), l'hybridation d'acides nucléiques (NAH, Nucleic-acid Hybridisation), les épreuves à base de micro- et macro-puces et les diverses techniques d'amplification d'acides nucléiques comme la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ou les méthodes d'amplification isothermiques comme l'amplification basée sur les séquences d'acides nucléiques (NASBA, Nucleic Acid Sequence Based Amplification) ou l'amplification isothermique par clivage invasif ou par la méthode dite LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification). Comme les épreuves de NAH, de micro- et macro-puces et les diverses épreuves d'amplification utilisent pour cibles les molécules d'acides nucléiques, elles sont également appelées méthodes de diagnostic moléculaire.

Les méthodes les plus usuelles de détection indirecte d'agents infectieux sont les épreuves sérologiques, telles que la neutralisation virale, l'ELISA, les épreuves d'inhibition de l'hémagglutination, puis une série de méthodes techniques plus récentes telles que les biocapteurs, la bioluminescence, la polarisation de fluorescence, la chimioluminescence, etc. En général, les laboratoires de diagnostic utilisent simultanément les méthodes directes et indirectes, afin d'obtenir le plus de certitude possible pour un diagnostic.

Les expériences des deux dernières décennies indiquent que les techniques de PCR vont finalement supplanter bon nombre des méthodes directes classiques de détection d'agents infectieux. Il apparaît clairement que la PCR est en train de remplacer l'isolement de virus ou la culture de bactéries, pour la détection d'agents difficiles ou impossibles à cultiver. Il existe plusieurs raisons à cette tendance qui incluent le fait que l'isolement de virus nécessite: i) la présence de microorganismes qui se multiplient (virus ou bactéries) ; ii) des locaux et des équipements coûteux pour les cultures cellulaires et la maintenance ; iii) un minimum de plusieurs semaines pour réaliser le diagnostic ; et iv) une expertise particulière qui manque ou diminue aujourd'hui dans bon nombre de laboratoires. Bien qu'initialement les épreuves de PCR aient été coûteuses et lourdes à mettre en œuvre, elles sont maintenant devenues des outils relativement peu chers, sûrs et d'emploi facile dans les laboratoires de diagnostic (2-4, 6, 7, 11-13). La sensibilité et la spécificité de la PCR sont généralement meilleures que les procédures d'isolement ou les ELISA de capture d'antigène. L'introduction de diverses méthodes de PCR en temps réel, des automates pour l'extraction des acides nucléiques et des plateformes automatisées a résulté à l'heure actuelle en un grand arsenal d'épreuves robustes, très rapides et fiables pour le diagnostic moléculaires. Dans ce chapitre les applications diagnostiques des diverses méthodes de PCR sont résumées avec un intérêt particulier pour l'harmonisation et la validation au niveau international.

A. MÉTHODES DE PCR UTILISÉES EN DIAGNOSTICS MOLÉCULAIRES DE ROUTINE

1. Les principes de la PCR

La réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) implique qu'il y ait dans cette technique une amplification basée sur une réaction enzymatique. Le terme de « réaction en chaîne » fait référence à plusieurs cycles de copies de l'ADN spécifique, issus dans ce cas du génome d'un agent infectieux. La région devant être amplifiée est délimitée par deux (ou plus) séquences nucléotidiques courtes, appelées sites d'amorce, qui encadrent la séquence cible. Les amorces, oligonucléotides courts complémentaires des sites d'amorce, se lient à la chaîne d'ADN devant être copiée. En utilisant une polymérase, qui n'est pas dénaturée au cours des cycles de chaleur, il est possible de copier la séquence ciblée par l'ajout aux amorces de nucléotides libres. En répétant les cycles de chaleur 20 à 40 fois, le taux de copies d'ADN cibles acquises augmente de façon exponentielle en produisant suffisamment pour les opérations suivantes, telles que la détection, le clonage ou le séquençage. La sensibilité du diagnostic par PCR est très élevée car plusieurs millions de copies de la cible sélectionnée sont produites. La spécificité peut également être très élevée selon les séquences nucléotidiques spécifiques des cibles sélectionnées, et le motif des amorces. Les amorces peuvent être choisies pour détecter des séquences de nucléotides très spécifiques dans les génomes des agents infectieux sélectionnés, ou peuvent être choisies pour être complémentaires de régions bien conservées du génome, permettant ainsi la détection des membres d'une famille ou du genre d'un agent infectieux. Une synthèse détaillée des techniques moléculaires a été publiée (17).

a) Amplification de l'ADN

Si le génome de l'agent infectieux est de l'ADN, l'amplification est effectuée directement, avec ou sans purification préalable de l'ADN cible. Dans de nombreux cas, l'utilisation d'ADN extrait ou purifié à partir d'un matériel devant être analysé (ex : du sang) permet d'augmenter la sensibilité analytique et diagnostique.

b) Amplification d'ARN (PCR par transcription inverse)

Les génomes de nombreux agents infectieux contiennent de l'acide ribonucléique (ARN) qui ne peut pas être amplifié directement par PCR. Pour l'amplification par PCR, de l'ADN cible simple brin est nécessaire, mais n'est pas disponible dans le cas de virus à ARN. Ce problème peut être résolu par l'addition d'une étape avant de commencer la PCR. En utilisant une transcriptase inverse, il est possible de transcrire l'ARN en ADN complémentaire (ADNc), qui est un ADN double brin et peut être utilisé dans une épreuve de PCR (cette procédure est appelée PCR couplée à la transcription inverse : RT-PCR). Traditionnellement, la réaction de transcription inverse était effectuée dans un tube de réaction séparé et l'ADNc produit, transféré ensuite dans un nouveau tube pour la PCR. Cependant, sont maintenant disponibles dans le commerce des polymérases d'ADN stables à la chaleur, ayant une activité de transcriptase inverse, et des tampons dans lesquels la RT et les polymérases d'ADN sont actives. Les deux permettent de réaliser une réaction de RT-PCR dans un même tube et en une séquence directe sans manipulations supplémentaires limitant ainsi les risques de contaminations. Dans la plupart des cas, il sera nécessaire d'extraire et de purifier l'ARN avant la transcription inverse.

c) Détection d'amplicon de PCR

Le produit de PCR, ou amplicon, peut être détecté en utilisant une variété de procédures. La plus commune inclue une détection non spécifique des produits de PCR basée sur la taille de l'amplicon en utilisant l'électrophorèse en gel d'agarose et la révélation de l'ADN avec un colorant intercalant non spécifique, tel que le bromure d'éthidium (il est possible actuellement de remplacer ce dernier par des colorants non carcinogènes comme le GelRed). Une reconnaissance spécifique de la séquence cible amplifiée peut être effectuée par transfert de l'ADN en Southern blot suivi d'une hybridation avec les sondes d'oligonucléotides complémentaires de la séquence cible. Les sondes d'hybridation peuvent être une enzyme, être chimioluminescente, ou marquée par un radionucléotide pour permettre la détection visuelle de la séquence cible spécifique.

Quelques exemples de méthodes de PCR couramment utilisées sont donnés ci-dessous.

2. PCR conventionnelle

La « PCR conventionnelle » (ou simplement PCR) utilise une paire d'amorce d'oligonucléotides pour amplifier une petite partie du génome de l'agent infectieux. La sensibilité analytique est typiquement élevée avec un nombre minimum de 100 à 1 000 copies de l'ADN cible détectable. La spécificité analytique peut être élevée, en fonction de la sélection de la cible, le motif des amorces et le test d'optimisation. La sensibilité et la spécificité analytiques peuvent, toutes les deux, être améliorées en effectuant une PCR nichée (voir le point 3 ci-dessous). Les méthodes de détection, telles que le *Southern blotting* suivi de l'hybridation avec des sondes, peuvent encore améliorer la sensibilité et la spécificité, mais elles demandent du temps, nécessitent la manipulation au

laboratoire d'ADN amplifié, et l'interprétation des résultats peut être techniquement subjective. Étant donné la complexité et le coût, ces méthodes de détection ne sont généralement pas considérées aujourd'hui comme des procédures adaptées à une utilisation courante en laboratoire de diagnostic.

3. PCR nichée

Les épreuves de PCR nichée utilisent deux jeux de cycles d'amplification avec 4 amorces, désignées amorces externe et interne. En général, les épreuves de PCR nichée procurent une sensibilité et une spécificité analytiques supérieures par rapport aux épreuves de PCR conventionnelles. Cependant, il existe un risque important de contamination croisée car les produits issus du premier cycle d'amplification sont souvent utilisés comme matrice de départ pour le deuxième cycle, ce qui peut entraîner des transferts de matériel entre les différents tubes de PCR. La PCR nichée a été en grande partie remplacée par des PCR en temps réel qui sont aussi sensibles mais au cours desquelles les risques de contamination sont réduits. La limite la plus faible de détection avec la PCR nichée est classiquement inférieure à 10 copies génomiques de l'ADN cible. La spécificité analytique est également augmentée car dans la PCR nichée, 4 amorces d'oligonucléotides doivent se lier spécifiquement avec les cibles sélectionnées afin de donner une réaction positive (4).

4. PCR en temps réel

La PCR en temps réel diffère de la PCR classique car les produits amplifiés de PCR sont détectés directement pendant les cycles d'amplification en utilisant des sondes d'hybridation qui augmentent la spécificité de l'épreuve. Des méthodes variées en temps réel, telles que TaqMan, les amorces Scorpions, le transfert d'énergie résonant (FRET pour *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), le transfert d'énergie avec sonde-amorce (PriProET pour *Primer-Probe Energy Transfer*), SybrGreen, Light-Upon-eXtension (LUX) ou les techniques *Molecular Beacon* sont devenues des outils utilisés en routine pour la détection d'agents infectieux. La PCR en temps réel a été utilisée pour la détection de bactéries, de virus ou de parasites issus d'un grand éventail d'espèces animales (2-4, 14, 17). Ces nouvelles techniques présentent plusieurs avantages supplémentaires par rapport aux méthodes de PCR « classiques » conventionnelles ou de PCR nichées. En général, une seule paire d'amorce est utilisée, ce qui procure une sensibilité souvent proche ou égale à celle de la PCR nichée traditionnelle, mais avec un risque beaucoup plus faible de contamination. La fluorescence, indiquant la présence du produit amplifié, est mesurée à travers le couvercle ou le côté du tube de réaction et une manipulation post-PCR de l'ADN amplifié n'est pas nécessaire. Ces procédures prennent nettement moins de temps comparées à la détection traditionnelle du produit de PCR post-amplification en gels d'agarose suivi d'une révélation en bromure d'éthidium ou de colorant équivalent pour la détection de l'ADN, et là encore, le risque de contamination est réduit. L'utilisation d'un format en plaque de microtitration à 96 puits, sans besoin de PCR nichée, permet d'automatiser la procédure et de l'adapter à des dosages de grande envergure (10, 17). Le diagnostic peut être encore plus automatisé par l'utilisation de robots pour les extractions d'ADN/ARN et le pipetage. En comparaison avec les méthodes classiques d'amplification, un autre avantage de la PCR en temps réel est la possibilité de réaliser une épreuve quantitative (6, 7). Avec une PCR en temps réel, le délai de diagnostic peut être réduit de quelques heures à quelques minutes. La PCR en temps réel peut aussi être utilisée comme une PCR à transcription inverse en utilisant un protocole à une étape ; cela permet aux étapes de RT et de PCR de se dérouler dans le même tube au cours du même protocole de PCR (17).

5. PCR multiplexe

Les PCR utilisant des amorces multiples dirigées contre différentes cibles en une seule épreuve sont appelées épreuves de PCR multiplexe. En PCR multiplexe, des agents infectieux variés peuvent être détectés et différenciés dans un même tube et en même temps. Les différentes cibles de PCR amplifiées dans une épreuve classique de PCR sont identifiées à partir de la taille des produits de PCR. L'utilisation des méthodes classiques de PCR nichée pour la construction d'épreuves multiplexes est compliquée par la nécessité pour les cibles d'être de différentes tailles, et par le fait que les amorces peuvent entrer en compétition dans le même mélange réactionnel. Ces deux facteurs peuvent avoir un impact négatif sur l'efficacité de la PCR. En revanche, le concept de PCR en temps réel (paires d'amorce unique) donne d'excellentes possibilités pour la construction de systèmes multiplexes à haute sensibilité (4, 9) basés sur une taille plus uniforme des cibles, des conditions d'amplification uniformes et une détection différentielle des cibles en utilisant des sondes d'hybridation spécifiques marquées avec des fluorophores différents. Il convient de remarquer que des amorces communes peuvent être utilisées afin d'amplifier des régions spécifiques du génome d'un groupe d'agents pathogènes, puis des sondes (TaqMan) fluorescentes peuvent être employées pour discriminer entre les membres de ce groupe. Il ne s'agit pas d'une PCR multiplexe à proprement parler, bien que cette technique soit décrite à tort comme telle.

6. Autres méthodes de diagnostic moléculaire

Bien que ce chapitre concerne essentiellement le diagnostic basé sur des techniques de PCR, il convient de mentionner brièvement qu'outre la PCR, il existe beaucoup de nouvelles méthodes pour la détection moléculaire des agents pathogènes comme, par exemple, les méthodes d'amplification isothermiques (amplification basée

sur la séquence des acides nucléiques [NASBA, *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*], amplification isothermique par clivage invasif ou par la méthode LAMP [*Loop-mediated Isothermal Amplification*]), diverses épreuves avec des micro- ou macro-puces utilisant des sondes padlock, des amplifications basées sur un cycle tournant et d'autres approches moléculaires. Il existe d'autres approches qui sont en cours de développement pour détecter et analyser les produits de PCR comme MALDI et Luminex. L'avantage de ces approches, associées avec une PCR multiplexe, est que le typage des différentes souches ou types d'un micro-organisme est maintenant possible. Il est évident que la gamme des outils du diagnostic moléculaire est renforcée par ces méthodes.

B. PRINCIPES DE VALIDATION DES ÉPREUVES DE DÉTECTION DES ACIDES NUCLÉIQUES

Lorsque l'on réalise des analyses sur du matériel clinique, il est important de fournir des données de bonne qualité. Pour cela, quelques critères clés doivent être remplis. La mise en place de systèmes d'assurance qualité (AQ) et de contrôle qualité (CQ) est nécessaire, comme par exemple un ensemble de protocoles qualité, incluant l'utilisation d'échantillons témoins qui assure que le système fonctionne convenablement et confirme la reproductibilité des données et leur qualité. Les systèmes AQ et CQ, combinés à un personnel compétent et entraîné, ont déjà été établis dans de nombreux laboratoires de par le monde. Le test de validation est un autre facteur essentiel pour assurer que les résultats de l'épreuve reflètent le statut réel des échantillons (8).

Pour évaluer la performance d'une épreuve de diagnostic, il est nécessaire d'utiliser une méthode de validation pour documenter la performance attendue de l'épreuve en question. La validation est une évaluation d'une épreuve de diagnostic afin de déterminer comment l'épreuve satisfait à une utilisation particulière. Les principes généraux de la validation d'épreuves peuvent être trouvés dans le Chapitre 1.1.4., « Principes de validation des méthodes de diagnostic des maladies infectieuses ». Ce chapitre étend ces principes de validation aux épreuves moléculaires de diagnostic. Pour des explications concernant des termes et des définitions, veuillez consulter le Chapitre 1.1.4.

C. VALIDATION D'UNE ÉPREUVE – INTRODUCTION

1. Choix d'une épreuve adaptée à son emploi futur

Les épreuves de PCR peuvent être adaptées à de nombreux objectifs. Il est en général possible d'utiliser la PCR chaque fois qu'il faut réaliser la détection directe d'un agent infectieux. Au cours des premières années du développement des techniques pour le diagnostic par PCR, de nombreux laboratoires ont été confrontés à des problèmes de performances et de contamination ; la PCR avait donc une mauvaise réputation comme technique adaptée au diagnostic. Les améliorations de ces dernières années ont inversé cette opinion. Les nouvelles technologies (par ex : la PCR en temps réel) font que la PCR est moins susceptible de donner de faux résultats du fait de contaminations et qu'elle est plus facile à réaliser. En outre, l'extraction automatique des acides nucléiques et les procédures de pipetage automatisées ont considérablement diminué les coûts, amélioré la répétabilité, et réduit la charge de travail. Pendant les « premières années », de nombreuses épreuves « faites maison » ont été développées par les laboratoires sans harmonisation ni validation (ou très peu). L'OIE, les laboratoires nationaux et les Laboratoires de référence de l'Union Européenne (ECRL, *European Community Reference Laboratories*) ont un grand rôle à jouer dans la conduite de programmes de validation et d'harmonisation. Il convient de reconnaître que la technique de PCR telle qu'elle est réalisée à l'heure actuelle est sûre (les risques de résultats faussement positifs sont considérablement plus faibles), qu'elle est en règle générale validée sous une forme ou une autre, et bien adaptée aux emplois pour lesquels elle est développée. Quelques exemples démontrant l'importance de la PCR sont donnés ci-dessous, et les définitions du ou des objectifs peuvent être trouvées au Chapitre 1.1.4.

- Permettre le diagnostic quand le titre en anticorps est si faible qu'une exposition à l'agent pathogène ne peut pas être confirmée par un test sérologique (par ex : le test immuno-enzymatique [ELISA] donnant à plusieurs reprises des résultats douteux lors de programmes d'éradication de la leucose bovine enzootique).
- Assurer la distinction entre infection et immunité d'origine maternelle chez les jeunes animaux (par ex : les veaux lors de programmes d'éradication).
- Détecter l'acide nucléique (bactérien ou viral) quand les prélèvements pour le diagnostic ne sont pas compatibles avec l'isolement du fait de leur toxicité (par ex : le sperme, les fœtus momifiés).

- Dans les phases finales de programmes d'éradication, quand une recherche approfondie de rares cas est nécessaire (par ex : en cas de latence avec un herpesvirus ou le dépistage des animaux faiblement réactifs au cours des programmes d'éradication de la maladie d'Aujeszky).
- Faire la distinction entre les souches vaccinales et les souches sauvages (stratégie DIVA, *differentiating infected from vaccinated animals*).
- Élaborer les relations phylogénétiques des virus et utiliser ces informations en épidémiologie moléculaire.
- Permettre un premier diagnostic rapide et sûr lors de l'apparition de foyers (par ex : les foyers d'influenza aviaire hautement pathogène en 2006).
- Estimer la charge virale (par ex : dans les infections à circovirus porcin type 2).
- Dépistage rapide des animaux vaccinés qui semblent présenter des symptômes.
- Détection d'agents pathogènes mutants résistants aux antibiotiques, etc.
- Démontrer l'absence d'infection chez les animaux vivants ou les produits d'origine animale. Cependant, il convient de remarquer que certains animaux infectés peuvent ne pas avoir d'acide nucléique détectable dans les tissus examinés.

2. Considérations préliminaires sur le développement d'une épreuve

a) Précautions et témoins

En raison de l'incertitude en ce qui concerne la sûreté et la fiabilité de la PCR utilisée en routine pour le diagnostic, des précautions particulières doivent être prises dans les laboratoires utilisant cette technique pour la détection des agents infectieux afin d'éviter les réactions faussement positives ou faussement négatives. Ces précautions associées à des témoins internes (imitant les résultats) garantissent une interprétation correcte des résultats, sans réponses faussement positives dues à des contaminations. Les témoins internes réels utilisant des « gènes de ménage » rentrent en compétition avec la séquence cible mais seulement pour les réactifs en excès tels que la polymérase et les nucléotides. Un minimum de compétition implique que la quantité de la cible soit connue, ce qui n'est pas le cas avec les échantillons de terrain. Des ARNs « en armure » (*Armored RNA*®) permet au mime d'être ajouté au cours de l'étape d'extraction, ce qui permet de savoir si l'extraction a été réalisée avec succès. L'inconvénient de l'utilisation de « gènes de ménage » comme témoins internes est qu'ils peuvent être présents en grande quantité chez les agents pathogènes recherchés.

b) Précautions à prendre pour éviter des résultats faussement positifs

Des réactions faussement positives (échantillons négatifs se révélant positifs lors de la PCR) peuvent survenir lors de problèmes liés au laboratoire (contaminations croisées) ou de problèmes liés à l'épreuve elle-même (optimisation insuffisante des performances). Les erreurs proviennent soit du fait d'un transfert de produit à partir d'un échantillon positif soit, et c'est le cas le plus fréquent, du fait d'une contamination croisée à partir de produits issus d'expériences précédentes, et divers protocoles et équipements ont été utilisés pour éviter des réactions faussement positives. Les échantillons et les réactifs doivent être manipulés dans des hottes à flux laminaire séparées, hottes qui sont par ailleurs régulièrement décontaminées par des rayons UV (l'utilisation de la lumière ultra-violette exige un bon entretien pour être efficace) ou de l'eau de Javel. La mise au point et l'utilisation de portoirs et d'instruments pour ouvrir les tubes peuvent prévenir les résultats faux-positifs (2). En outre, il convient d'appliquer les bonnes pratiques de laboratoire notamment pour les étapes élémentaires (extraction de l'ADN, préparation du mélange réactif et des amorces, préparation des échantillons, électrophorèse sur gel d'agarose des produits de l'amplification, etc.) qui devront être réalisées dans des zones différentes du laboratoire ou dans des locaux distincts (Fig. 1 ; référence 1, 4, 17). Il faut aussi utiliser des lots différents de pipettes au cours de chaque étape. L'utilisation d'une pression positive ou de pointes à filtre est recommandée. Les différentes étapes devraient, dans la mesure du possible, être réalisées par des personnes différentes, chacune d'entre elles étant confinées à des zones limitées du laboratoire. Le maximum de précautions doit être pris pour éviter l'introduction de produits d'amplification dans les zones « propres » du laboratoire à partir de zones du laboratoire potentiellement contaminées en interdisant les échanges de papiers, de matériel, de personnes ou de tout autre vecteur de contamination. Les mouvements en sens inverse ne devraient être possibles qu'après décontamination des surfaces, des équipements, des tubes, etc., et après changement des blouses et des gants. Si l'on suspecte que l'échantillon contient une grande quantité d'agent pathogène ou d'acide nucléique, il est préférable de le diluer avant son introduction dans les zones « propres » du laboratoire.

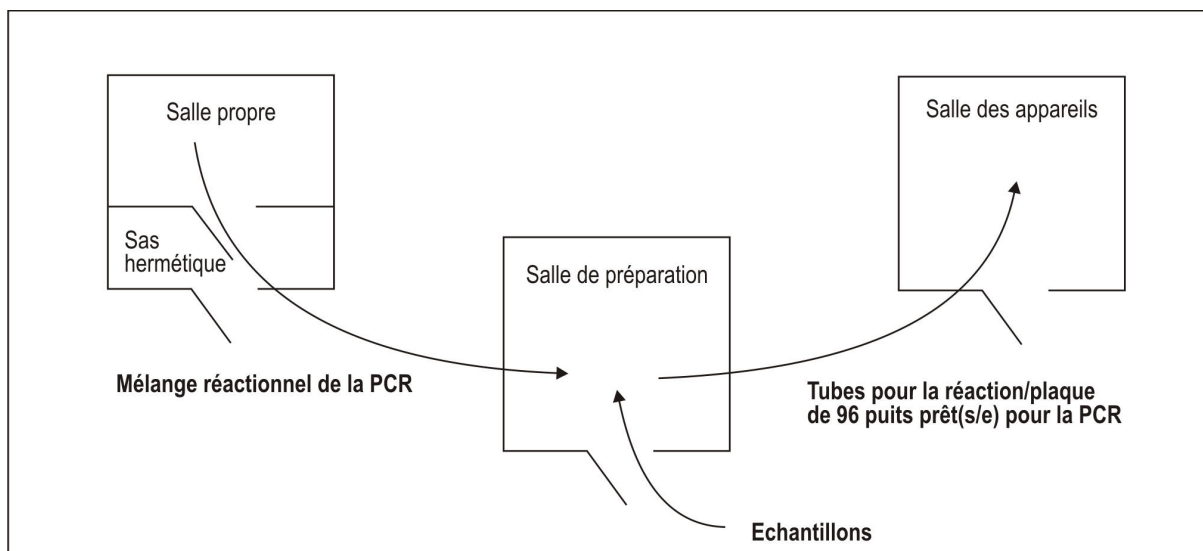


Figure 1. Organisation recommandée pour un laboratoire réalisant des diagnostics avec des PCR en temps réel.

Les échantillons à tester sont transférés dans la « salle de préparation » pour l'extraction des acides nucléiques. Le mélange réactionnel pour la PCR est préparé dans la « salle propre » et transféré dans la « salle de préparation » pour réaliser la répartition dans les plaques de PCR et l'addition de la matrice. Les plaques ou les tubes prêts pour la réaction sont alors transférés dans la « salle des appareils » pour réaliser la PCR. La « salle propre » n'est utilisée que pour la préparation du mélange réactionnel de la PCR ; il est interdit d'y introduire de l'ADN ou des produits d'amplification. Il est recommandé de disposer avant la « salle propre » d'un sas hermétique dans lequel le personnel peut prendre les blouses et les chaussures uniquement utilisées dans cette salle. La « salle de préparation » ne sert qu'au traitement des échantillons et à la mise en place de la PCR (avec le mélange réactionnel préparé dans la « salle propre »). Il est interdit d'introduire dans cette salle des produits d'amplification et rien de ce qui vient de la « salle de préparation » ne doit être introduit dans la « salle propre ». Les thermocycleurs se trouvent dans la « salle des appareils » et aucun produit ne peut retourner de cette salle vers la « salle propre » ou la « salle de préparation ». Si le laboratoire possède un système de contrôle de la pression de l'air, la « salle propre » doit être en surpression par rapport aux autres salles. S'il est prévu de réaliser des PCR nichées, il est recommandé d'ajouter 2 autres salles. Une « deuxième salle de PCR » pour préparer la deuxième réaction de PCR (ce qui implique la manipulation de produits d'amplification ce qui interdit donc de le faire dans la « salle de préparation »), ainsi qu'une « salle d'électrophorèse » pour l'analyse des produits sur gel d'agarose.

Il est aussi extrêmement important d'inclure des témoins négatifs, par exemple des échantillons semblables à l'échantillon à tester mais qui ne contiennent pas la cible. Dans les laboratoires qui ont des problèmes de contaminations croisées, il est recommandé d'inclure au moins un témoin négatif pour 5 échantillons à tester. En outre, il convient d'inclure en routine des échantillons témoins tant négatifs que positifs dans des échantillons à tester pour estimer les performances de l'épreuve de PCR.

c) Précautions à prendre pour éviter des résultats faussement négatifs

La PCR s'est avérée une méthode très efficace pour détecter les acides nucléiques, comme le génome viral dans des échantillons cliniques. Cependant, dans les phases terminales de l'infection, un animal peut ne plus héberger d'acide nucléique dans les tissus soumis à l'épreuve. Dans ces cas, les résultats négatifs en PCR doivent, par conséquent, être considérés comme un élément d'un processus complexe de diagnostic.

Les résultats faux-négatifs (les échantillons contenant l'agent d'intérêt mais détectés comme négatifs) surviennent majoritairement à cause d'effets inhibiteurs et/ou d'erreurs de pipetage, cependant des mauvaises manipulations de l'échantillon peuvent aussi être à l'origine de tels résultats. De ce fait, des témoins internes sont utilisés comme indicateurs d'efficacité de l'épreuve de PCR. Les témoins internes de PCR peuvent comprendre de l'ADN étranger ajouté à l'échantillon ou de l'ADN ubiquitaire présent naturellement dans l'échantillon. De l'ADN étranger ajouté à l'échantillon, peut comprendre des mimes d'ADN ou d'ARN. Les mimes d'ADN, oligonucléotides de synthèse, ont les mêmes séquences de liaison d'amorce que les cibles de PCR, mais encadrent un fragment d'ADN hétérologue d'une taille différente. Les séquences de nucléotides identiques de liaison d'amorce permettent la co-amplification de la cible et du mime dans le même tube avec une compétition minimale. Les différences de taille donnent une discrimination facile par une analyse en *Southern blot*. L'*Armored RNA*[®], un concept identique aux mimes ADN, utilise un fragment d'ARN témoin enveloppé dans des protéines d'enveloppe de bactériophage pour protéger et stabiliser l'ARN pour le contrôle ou la normalisation des épreuves de RT-PCR (pour plus de détails sur les témoins, voir ci-dessus).

Avec les épreuves de PCR en temps réel, il est également possible d'utiliser des témoins internes, un gène ubiquitaire naturellement trouvé, un fragment sélectionné du génome de l'animal hôte tel que l'actine bêta, GAPDH, ou l'ARN ribosomique. En utilisant en multiplexe un tel témoin intrinsèque coloré avec un fluorophore rapporteur particulier, il est possible de tester la qualité de l'échantillon et de confirmer l'efficacité de la PCR, puisque l'agent cible et l'ADN intrinsèque sont détectés simultanément (14).

Les témoins internes (comme les mimes) augmentent la fiabilité du diagnostic par PCR (1, 4). Une précaution doit être prise lorsque l'on choisit et valide les témoins internes. Un contrôle important est nécessaire pour s'assurer que l'amplification de PCR du témoin interne ajouté n'entre pas en compétition avec la PCR du diagnostic et de ce fait ne diminue pas la sensibilité analytique. Les témoins internes sont utilisés à des concentrations légèrement supérieures à la limite de détection du diagnostic PCR pour s'assurer de la performance de l'épreuve. Il faut également se rappeler que les témoins internes ont un inconvénient similaire aux échantillons extrêmement infectés et non représentatifs d'acides nucléiques cibles et peuvent conduire à des résultats faux-négatifs.

d) Préparation des étalons

Les laboratoires de référence doivent fournir des échantillons de référence représentatifs d'un agent infectieux donné. De tels échantillons peuvent être des agents infectieux cultivés ou des prélèvements cliniques, etc., qui sont distribués de telle sorte que l'agent infectieux soit bien conservé. Ainsi, les échantillons sont distribués sous forme congelée, dans des solvants organiques (ex. Trizol) ou par d'autres moyens adaptés. Les échantillons peuvent également être envoyés sous forme d'acides nucléiques (congelés, déshydratés ou en éthanol). Pour des détails plus spécifiques, il faut se reporter aux chapitres concernant individuellement les maladies. Les laboratoires de référence doivent également fournir les mimes appropriés.

La disponibilité d'échantillons de référence est essentielle pour le succès du processus de validation. Il s'agit, malheureusement, du problème le plus délicat à résoudre lorsque l'on planifie une procédure de validation. Il ne suffit pas d'utiliser des agents pathogènes cultivés ou des échantillons expérimentaux ; de vrais échantillons provenant du terrain peuvent présenter des caractéristiques différentes de celles des échantillons provenant du laboratoire. Il peut être difficile d'obtenir des échantillons du terrain qui soient vraiment négatifs ou positifs du fait, notamment, que la PCR est généralement considérée comme ayant une sensibilité analytique supérieure à toutes les méthodes de référence (« *gold standard* »), ce qui rend difficile la détermination avec d'autres méthodes du statut des échantillons prévus pour la validation. Comme cela a été déjà signalé, les laboratoires de référence peuvent fournir de tels échantillons de référence. Une autre méthode consiste en l'utilisation des méthodes Bayésiennes qui offrent une approche probabilistique pour valider les tests diagnostics en l'absence de « *gold standard* » (5) ; ces méthodes ne sont pas abordées plus avant dans ce chapitre.

D. VALIDATION D'UNE ÉPREUVE – PREMIÈRE ÉTAPE

1. Optimisation et normalisation des réactifs et détermination des paramètres critiques de contrôle

La collecte d'échantillon, la préparation et le transport (se reporter au Chapitre 1.1.1., « Prélèvement et expédition des échantillons pour le diagnostic » de ce *Manuel terrestre*) et les méthodes d'extraction d'acide nucléique (se reporter au Chapitre 1.1.7., « Les biotechnologies dans le diagnostic des maladies infectieuses et le développement des vaccins ») sont tous des paramètres critiques dans la performance d'une épreuve et doivent être optimisés pour le diagnostic des maladies. Les méthodes adaptées varient en fonction du type d'échantillon et d'organisme. En général, le sérum sanguin, les tissus et les écouvillons sont des échantillons adaptés à une extraction facile des acides nucléiques, alors que les échantillons de fèces, les échantillons autolysés et la semence sont plus difficiles à manipuler. L'extraction des cibles à ARN diffère de l'extraction de cibles à ADN et l'ARN est plus enclin à la dégradation. Les méthodes commerciales (robotisées, colonnes de centrifugation, extractions basées sur le magnétisme, etc.) et les méthodes de base reposant sur la chimie sont utilisées pour l'extraction d'ARN et d'ADN. Il est crucial de déterminer la méthode d'extraction la plus reproductible et efficace avant de poursuivre la validation d'une épreuve. Si la méthode d'extraction est changée, des données équivalentes doivent être obtenues ou bien il faut répéter entièrement la procédure de validation.

Tout l'équipement utilisé au cours du processus doit être correctement entretenu. Les appareils (blocs de chauffage, réfrigérateurs, congélateurs, thermocycleurs, pipettes, etc.) qui nécessitent un étalonnage doivent être étalonnés en accord avec les protocoles d'assurance qualité du laboratoire. Il est aussi important de valider correctement le matériel et le protocole employé. Un bon exemple en est la généralisation des méthodes robotisées d'extraction dans les procédures de diagnostic de routine. Il ne suffit pas de comparer les caractéristiques de cette technique avec celles des autres méthodes d'extraction utilisées. Le robot et le protocole

doivent être validés pour vérifier qu'il n'existe pas de risque de contamination croisée, par ex. : travailler sur un mélange d'échantillons positifs et négatifs.

Au cours du développement d'épreuves de PCR « classique » ou en temps réel, tous les paramètres, protocoles et réactifs doivent être optimisés. Une épreuve normalisée est une technique qui donne de façon constante le même résultat à partir d'un échantillon donné quand elle est répétée plusieurs fois et réalisée par du personnel différent dans des laboratoires différents.

Au cours de l'optimisation de l'épreuve de PCR, il est également possible d'estimer la capacité de la méthode à ne pas être affectée par de petits changements dans les paramètres principaux. Une documentation sur les variations intentionnelles au cours de l'exécution d'une épreuve est nécessaire pour caractériser les paramètres critiques de l'épreuve. Des exemples de tels paramètres incluent : temps et température d'incubation, concentrations des tampons, des amorces, du $MgCl_2$, du pH, et du taux d'autres composants ajoutés (ex : dNTP, sérum albumine bovine, etc.). La caractérisation des paramètres critiques de contrôle est cruciale pour identifier ce qui doit être correctement contrôlés au cours de l'épreuve. Des variations intentionnelles de l'épreuve peuvent conduire à une estimation préliminaire de la robustesse de l'épreuve.

2. Répétabilité

Un accord entre les répétitions au sein et entre les réalisations d'une épreuve doit être convenu à cette étape. Cela donne une information importante sur l'épreuve avant de poursuivre la validation. Si une variabilité excessive est mise en évidence, elle doit être corrigée avant de continuer le processus de validation.

La répétabilité d'une épreuve de PCR nécessite que chaque réplicat soit traité comme un échantillon indépendant. Du fait de la variation d'un réplicat (en fait, un triplicat), 3 fractions aliquotes d'un sujet d'analyse de départ sont préparées et amplifiées, et la variation de la valeur moyenne est déterminée comme un indicateur de la répétabilité. Il est, par conséquent, inacceptable d'estimer les amplifications des triplicats à partir d'une seule extraction. De même, les réplicats de plusieurs essais doivent être traités comme des échantillons individualisés. Cette procédure conduira à des estimations de la variabilité intra- et inter-épreuves. Dans une épreuve de PCR en temps réel, les valeurs Ct obtenues à partir des échantillons répliqués peuvent être utilisées pour déterminer le coefficient de variation entre essais (CV ; voir Chapitre 1.1.3., « Gestion de la qualité dans les laboratoires de diagnostic vétérinaire », section 6.d) « Incertitude »).

Il est important que le sujet d'analyse à détecter par PCR soit dans la même matrice que les échantillons à tester destinés à être utilisés dans l'épreuve. Si, par exemple, l'épreuve est utilisée pour démontrer l'absence d'un agent pathogène dans une matrice connue pour ses propriétés inhibitrices dans la PCR (telle que la semence et les diluants), il est particulièrement important d'évaluer soigneusement la répétabilité.

Quand de nouveaux lots de nucléotides ou d'autres réactifs provenant de nouveaux fabricants sont employés dans l'épreuve, la répétabilité de l'épreuve doit à chaque fois être établie à nouveau.

3. Détermination de la spécificité et de la sensibilité analytiques

La sensibilité analytique (ou limite de détection) est définie comme la capacité à distinguer l'agent pathogène ciblé d'autres agents infectieux. Cette capacité est déterminée par l'analyse d'agents pathogènes génétiquement apparentés et de matériel clinique obtenus d'animaux atteints par des maladies qui ressemblent à celle pour laquelle l'épreuve est prévue. Il est préférable d'obtenir des échantillons de terrain à partir d'animaux infectés, mais cela peut se révéler difficile voire impossible. Dans ces cas, il est possible d'utiliser des virus cultivés sur cultures cellulaires. Le degré acceptable de réactivité croisée dépend en grande partie de l'objectif poursuivi par le test et doit être établi pour chaque cas. Il est utile de réaliser des études « par ordinateur » en complément des estimations par le laboratoire.

La sensibilité analytique (ou limite de détection) est définie comme le plus faible taux d'agent détecté par l'épreuve, et peut être représentée par le nombre de copies du génome, la dose infectieuse, les unités formant colonies, les unités formant plaque, etc., de l'agent pathogène qui peut être détecté et distingué d'un résultat nul. Pour déterminer la sensibilité analytique, une dilution en cascade est utilisée jusqu'à ce que l'épreuve ne puisse plus détecter la cible en question dans plus de 5 % des réplicats. Les fragments clonés des produits de PCR en question peuvent être utilisés comme échantillons de référence, soit comme ADN ou comme ARN cible, l'ARN étant transcrit *in vitro* en ADN. Les estimations de la sensibilité analytique peuvent varier significativement pour la même épreuve quand différentes matrices échantillons sont utilisées. Lorsqu'on réalise des séries de dilution, il est important d'employer un diluant dont les qualités sont semblables à la matrice échantillon, par exemple, dilution d'une semence positive dans de la semence négative et non dans un tampon.

E. VALIDATION D'UNE ÉPREUVE – SECONDE ÉTAPE

Les caractéristiques d'exécution (ou paramètres de l'épreuve) apportent les informations sur la façon dont la méthode fonctionne dans des conditions spécifiques. Quelques unes des caractéristiques d'exécution sont données dans le Chapitre 1.1.4.

1. Estimation des performances de l'épreuve

a) Populations animales de référence

i) Animaux de référence non infectés / non exposés

Des échantillons réellement négatifs, c'est-à-dire provenant d'animaux qui n'ont pas pu être exposés à l'agent pathogène sont parfois difficiles à obtenir. Il est souvent possible de récolter des échantillons dans des pays qui ont éradiqué la maladie en question. Il est important que les échantillons négatifs soient représentatifs des échantillons qui seront analysés (espèces, âges, sexes, races, etc.).

ii) Animaux de référence infectés / exposés

Trouver des animaux positifs de référence en nombre suffisant peut poser problème. Des animaux naturellement ou expérimentalement infectés sont nécessaires dont le statut positif est démontré par isolement de l'agent pathogène. Avant de recourir à des animaux expérimentalement infectés, voir le Chapitre 1.1.4.

iii) Statut de l'animal de référence établi par d'autres épreuves

Le terme « *gold standard* » est couramment utilisé pour décrire toute épreuve étalon servant à la comparaison mais devrait être réservé aux méthodes qui classent de façon univoque les animaux en infectés ou non-infectés. En général, on considère que les nouveaux tests de PCR sont meilleurs que tous les « *gold standard* » actuellement existants et le « *gold standard* » retenu peut, par conséquent, ne pas être adapté pour la comparaison. Ceci est particulièrement vrai lorsqu'il s'agit de démontrer qu'un animal négatif de référence est vraiment négatif. La validation des techniques moléculaires en les comparant à un « *gold standard* » peut être compliquée du fait que les PCR sont plus sensibles, ce qui entraîne une spécificité apparente plus faible. Ce problème peut, dans une certaine mesure, être résolu par une bonne appréciation de l'origine des échantillons, l'historique de la maladie et en séquençant tous les produits d'amplification de la PCR pour confirmer l'identité de l'agent pathogène.

2. Détermination du seuil de coupure

La sensibilité du diagnostic (Se-D : proportion d'animaux de référence connus pour être infectés, connus, qui sont détectés comme positifs dans l'épreuve) et la spécificité du diagnostic (Sp-D : proportion d'animaux de référence non-infectés et qui sont détectés comme négatifs dans l'épreuve) sont les paramètres les plus importants obtenus au cours de la validation d'une épreuve. Le nombre d'échantillons de référence requis pour déterminer l'estimation et l'erreur admissible de la Se-D et la Sp-D peut être calculé. Pour cela, une prédiction raisonnable de la Se-D et la Sp-D doit être utilisée. Généralement, la confiance dans l'estimation est posée à 95 %. Cependant, aucune formule ne prend en compte les nombreux facteurs hôte/organisme qui peuvent affecter le résultat d'une épreuve. Le nombre d'échantillons pour déterminer l'estimation de la Se-D et la Sp-D est indiqué dans le Chapitre 1.1.4. En pratique, il peut être difficile d'obtenir un nombre suffisant d'échantillons pour calculer un intervalle de confiance satisfaisant, particulièrement dans le cas d'une maladie non endémique ou répandue ; mais avec le temps, des données supplémentaires améliorent l'estimation du seuil de confiance. L'utilisation d'échantillons expérimentalement infectés n'est pas appropriée car cela peut ne pas être représentatif d'échantillons naturellement infectés. Si des échantillons provenant d'animaux naturellement infectés ne sont pas disponibles, des infections expérimentales réalisées par des moyens qui se rapprochent des infections naturelles peuvent fournir des échantillons utiles. Un exemple est donné par les maladies transmises par des tiques et pour lesquelles les animaux sont exposés à des tiques.

Il n'est pas toujours possible de se conformer aux lignes directrices (par ex. : les recommandations de l'OIE pour la validation des tests). Lorsque l'on ne possède qu'un petit nombre d'échantillons pour une évaluation d'un test ou en l'absence d'un « *gold standard* », une approche consiste à déclarer une épreuve moléculaire comme « partiellement validée » puis à améliorer la validation quand un nombre significatif d'échantillons cliniques est testé. Dans ce cas, les échantillons positifs sont confirmés par d'autres techniques, telles que l'isolement de l'agent pathogène en question ou le séquençage ; on vérifie aussi que les échantillons négatifs conviennent à l'épreuve de PCR (non inhibiteurs) en utilisant les gènes de contrôle. Le principe de cette validation « en cours de route » permet l'introduction rapide de nouvelles épreuves et la réduction des coûts de la validation. Cette approche n'est possible que si des tests sur une gamme appropriée de cultures, d'échantillons artificiellement préparés (pour les données analytiques) et d'échantillons cliniques (pour démontrer que la cible est présente dans les tissus) apportent des arguments sérieux pour considérer que l'épreuve peut être diffusée comme « partiellement validée » (15).

F. VALIDATION D'UNE ÉPREUVE – TROISIÈME ÉTAPE

1. Établir la reproductibilité de l'épreuve

La reproductibilité est un paramètre important de la précision d'une épreuve. Elle est déterminée dans plusieurs laboratoires qui utilisent la même procédure (protocole, réactifs et témoins). Au moins 3 laboratoires réalisent l'épreuve sur le même panel d'échantillons (un minimum de 20 échantillons), avec des fractions aliquotes identiques distribuées dans chacun des laboratoires. Cette opération fournira des informations sur la robustesse de l'épreuve. Les estimations de la reproductibilité sont essentielles avant que l'épreuve puisse être distribuée à d'autres laboratoires.

À l'heure actuelle, la reproductibilité n'est que rarement évaluée complètement dans les laboratoires de diagnostic vétérinaire qui réalisent des PCR. Dans le passé, beaucoup de laboratoires ont utilisé des épreuves mises au point dans ces mêmes laboratoires, vraisemblablement pour des raisons pratiques. Il convient, lorsque c'est possible, d'appliquer des techniques publiées et normalisées, notamment par les Laboratoires de référence de l'OIE, les Laboratoires de référence de l'Union Européenne ou les laboratoires nationaux. En outre, des procédures de validation inter-laboratoires doivent être conduites afin de normaliser les épreuves et d'harmoniser les activités de diagnostic entre les différents pays.

G. VALIDATION D'UNE ÉPREUVE – QUATRIÈME ÉTAPE

1. Mise en œuvre du programme

Les Laboratoires de référence jouent un rôle essentiel dans la mise en œuvre de nouvelles épreuves moléculaires ou d'épreuves déjà existantes en cours de validation. Il est instamment demandé aux Laboratoires de référence de l'OIE, aux Laboratoires de référence de l'Union Européenne et aux laboratoires nationaux d'aider à la généralisation de ces épreuves pleines de promesses pour le diagnostic des maladies. Un exemple en est l'assistance apportée par les laboratoires de l'OIE dans le diagnostic de la grippe aviaire en Europe par des méthodes moléculaires.

2. Suivi de la validité des performances de l'épreuve

a) Interprétation des résultats de l'épreuve – facteurs affectant la validité de l'épreuve

Un facteur essentiel qui affecte l'interprétation des résultats de l'épreuve est la prévalence du sujet d'analyse dans la population cible. Même une épreuve de PCR très précise et exacte avec une Se-D et une Sp-D approchant 99 % peut néanmoins conduire à de fausses conclusions (voir Chapitre 1.1.4). En ce qui concerne les épreuves basées sur les acides nucléiques, les résultats faussement positifs sont particulièrement préoccupants dans les populations ayant une faible prévalence. Dans ces cas, il peut être nécessaire de confirmer les résultats positifs en PCR par l'analyse des séquences du produit d'amplification afin de corriger d'éventuelles erreurs dues à des cibles ou une fixation des amorces non spécifiques.

b) Maintien des critères de validation

Quand l'épreuve est utilisée en routine, il est important d'assurer un contrôle de qualité interne. L'épreuve doit donc être suivie et contrôlée constamment pour la répétabilité et l'exactitude. L'OIE recommande que des estimations de la reproductibilité entre laboratoires (organisation de tests de compétence inter-laboratoires) soient conduites au moins 2 fois par an (16). Cette procédure est, en général, menée par un laboratoire de référence qui distribue les panels d'échantillons, récupère les résultats des laboratoires, analyse les données et rédige un rapport envoyé aux laboratoires. Si une épreuve doit être appliquée dans une autre région géographique et/ou population, il peut s'avérer nécessaire de revalider ou de documenter son équivalence dans les nouvelles conditions. La revalidation ou l'équivalence devrait être déterminée si l'épreuve est appliquée à une matrice différente d'échantillons, par ex. validé sur sang et utilisé sur un autre tissu, ou validé sur des tissus de bovins et utilisé sur une autre espèce. Des protocoles différents d'extraction peuvent être nécessaires si des espèces ou des tissus différents sont testés, car certains peuvent contenir des facteurs inhibiteurs différents. Ceci est particulièrement vrai pour des épreuves PCR puisqu'il est commun que des mutations ponctuelles surviennent dans de nombreux agents pathogènes (par exemple les virus à ARN). Les mutations, qui peuvent survenir au sein de sites d'amorces ou de sondes, peuvent affecter l'efficacité d'une épreuve et de ce fait les critères établis de performance ne sont plus valides. Il est également recommandé de confirmer régulièrement la séquence cible dans les régions génomiques sélectionnées pour des isolats nationaux ou régionaux d'agents infectieux. Ceci est particulièrement vrai pour les sites d'amorce, pour s'assurer qu'ils restent stables et que, de cette manière, la validation d'une épreuve ne peut pas être mise en question. La validation et l'estimation de la robustesse

peuvent nécessiter d'être répétées lorsque l'épreuve est transférée du laboratoire qui le développe vers le terrain car les conditions peuvent être inférieures aux conditions optimales et le personnel moins bien formé.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BALLAGI-PORDÁNY A. & BELÁK S. (1996). The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol. Cell. Probes*, **10**, 159–164.
2. BELÁK S. & THORÉN P. (2001). Molecular diagnosis of animal diseases. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **1**, 434–444.
3. BELÁK S. (2005). The molecular diagnosis of porcine viral diseases: a review. *Acta Vet. Hung.*, **53**, 113–124. (Review).
4. BELÁK S. (2007). Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects. A view from the OIE Collaborating Centre for the Application of Polymerase Chain Reaction Methods for Diagnosis of Viral Diseases in Veterinary Medicine. *Vaccine*, **25**, 5444–5452.
5. BRANSCUM, A.J., GARDNER I.A. & JOHNSON W.O. (2005). Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modelling. *Prev. Vet. Med.*, **68**, 145–163.
6. BURNS M.J., NIXON G.J., FOY C.A. & HARRIS N. (2005). Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods - evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol.*, **5**, 31–44.
7. BUSTIN S.A. (2005). Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **5**, 493–498.
8. BURKHARDT H.J. (2000). Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **38**, 87–91.
9. ELNIFRO E.M., ASHSHI A.M., COOPER R.J., & KLAPPER P.E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**, 559–570.
10. JUNGKIND D. (2001). Automation of laboratory testing for infectious diseases using the polymerase chain reaction – our past, our present, our future. *J. Clin. Virol.*, **20**, 1–6.
11. HUGGETT J., DHEDA K., BUSTIN S. & ZUMLA A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.*, **6**, 279–284. (Review).
12. LAUERMAN L.H. (2004). Advances in PCR technology. *Anim. Health Res. Rev.*, **5**, 247–248. (Review).
13. LOUIE M., LOUIE L. & SIMOR A.E. (2000). The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ*, **163**, 301–309.
14. MACKAY I.M., AARDE K.E. & NITSCHKE A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1292–1305.
15. SAWYER J., WAKELEY P., WEST D., FEARNLEY C., ANDERSON S., FLOWERS M., WEBSTER K., ERRINGTON J. & WILLIAMS R. (2006). Discussion 324-5, Practical experiences of moving molecular diagnostics into routine use at the Veterinary Laboratories Agency. *Dev. Biol. (Basel)*, **126**, 89–97.
16. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2002). OIE Guide 3: Laboratory Proficiency Testing. In: OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. OIE, Paris, France, 53–63.
17. VILJOEN G.J., NELL H & CROWTHER J.R. (2005). Molecular Diagnostic PCR Handbook. IAEA-FAO, Springer, Dordrecht, The Netherlands.

*
* *

NB : Il existe un Centre collaborateur de l'OIE pour le diagnostic basé sur la biotechnologie des maladies infectieuses en médecine vétérinaire (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

MÉTHODES DE LABORATOIRE UTILISÉES POUR LES ESSAIS D'ANTIBIORÉSISTANCE

INTRODUCTION

Historiquement, les médecins et les vétérinaires choisissaient les antimicrobiens pour soigner les maladies infectieuses bactériennes d'abord sur la base des expériences cliniques précédentes. Cependant, du fait de l'accroissement du nombre des résistances bactériennes vis-à-vis des antimicrobiens traditionnels, il est de plus en plus difficile pour les cliniciens de choisir de façon empirique les agents antimicrobiens appropriés (15). De ce fait, les essais in vitro de sensibilité des agents pathogènes aux antimicrobiens (AST pour antimicrobial susceptibility testing) doivent utiliser des méthodes validées à partir d'échantillons correctement prélevés. Ainsi, l'AST est-il un élément important de l'utilisation prudente des antimicrobiens pour la production animale mondiale et ces données devraient être disponibles pour les vétérinaires de tous les pays pour une prise de décision en toute connaissance de cause (1).

Bien qu'une grande variété de méthodes existe, le but des essais in vitro de sensibilité des agents pathogènes aux antimicrobiens est de prédire comment un micro-organisme répondra vraisemblablement à une thérapie antimicrobienne chez l'hôte infecté. Ce genre d'information aidera le clinicien à choisir l'antimicrobien adéquat, à développer une politique de l'usage des antimicrobiens et d'apporter des données à la surveillance épidémiologique. Les données d'une telle surveillance épidémiologique fournissent une base afin de choisir le traitement empirique approprié (thérapie de première ligne) et pour détecter l'émergence et/ou la dissémination de souches bactériennes résistantes ou des déterminants d'une résistance dans différentes espèces bactériennes. Le choix d'une méthode d'AST est basé sur de nombreux facteurs comme la validation des données, l'aspect pratique, la flexibilité, l'automatisation, le coût, la reproductibilité et la préférence individuelle.

L'utilisation des approches génotypiques pour détecter les gènes de résistance aux antimicrobiens a aussi été encouragée afin d'améliorer la rapidité et l'exactitude des tests. De nombreuses épreuves basées sur l'ADN sont en cours de développement afin de détecter la résistance des bactéries aux antibiotiques au niveau génétique. Ces méthodes, quand elles sont utilisées en association avec des analyses phénotypiques, permettent d'espérer une amélioration de la sensibilité, de la spécificité et de la rapidité dans la détection des gènes de résistance connus et peuvent être utilisées en même temps que les méthodes d'AST traditionnelles.

INTRODUCTION

La diffusion d'un grand nombre de bactéries pathogènes résistantes à plusieurs antimicrobiens a été reconnue par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE), l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme un problème sérieux tant pour la santé humaine qu'animale. L'apparition d'une résistance bactérienne aux antimicrobiens n'est ni inattendue ni un phénomène récent. Cependant, elle représente une situation de plus en plus préoccupante en raison de la fréquence avec laquelle de nouveaux phénotypes de résistance apparaissent parmi les agents pathogènes et même chez les microorganismes commensaux.

Auparavant, de nombreuses infections pouvaient être traitées avec succès uniquement sur la base de l'expérience du clinicien (par ex. thérapie empirique). Toutefois, cela n'est plus la règle et devient de plus en plus rare. Une résistance vis-à-vis de pratiquement tous les antimicrobiens mis sur le marché en médecine humaine et vétérinaire a été observée. Cette observation associée à la grande variété d'antimicrobiens couramment utilisés

rend le choix d'un agent approprié de plus en plus difficile. Cette situation a rendu les cliniciens plus dépendants des données des essais *in vitro* et souligne l'importance du laboratoire de diagnostic dans la pratique clinique.

Il existe de nombreuses méthodes d'essais de sensibilité des agents pathogènes aux antimicrobiens (AST pour antimicrobial susceptibility testing). Le choix d'une méthode dépend de nombreux facteurs comme l'aspect pratique, la flexibilité, l'automatisation, le coût, la reproductibilité, l'exactitude et les préférences personnelles. La normalisation et l'harmonisation des méthodologies AST, utilisées au niveau de la surveillance épidémiologique de la résistance aux médicaments antimicrobiens, sont critiques si les données doivent être comparées parmi les programmes de surveillances nationaux ou internationaux des Pays membres de l'OIE. Il est essentiel que les méthodes d'AST fournissent des résultats reproductibles au niveau des essais quotidiens en laboratoire et que les données soient comparables avec les résultats obtenus par une méthode reconnue de référence (« gold standard »). En l'absence de normalisation ou d'harmonisation des méthodes ou des procédures de références, les résultats de sensibilité de différents laboratoires ne peuvent être comparés. La méthode utilisée dans le choix des prélèvements pour les programmes de surveillance des résistances antimicrobiennes, ainsi que les méthodes utilisées pour l'isolement primaire des bactéries sont des facteurs importants qui doivent être normalisés et harmonisés afin de permettre une comparaison directe des résultats entre différentes régions ; ces problèmes sont traités dans un document de l'OIE (17).

Au fur et à mesure que les connaissances dues aux AST progressaient, la compréhension des nombreux facteurs qui peuvent affecter la sensibilité des tests s'est améliorée. Ce chapitre fournit les lignes directrices des méthodologies AST et inclut les procédures pour normaliser et harmoniser l'interprétation des résultats des essais d'antibiorésistance.

1. Conditions de l'essai

Afin de réaliser la normalisation des méthodes d'AST et la comparaison de leurs résultats, les conditions suivantes s'appliquent :

- i) l'utilisation de méthodes d'AST normalisées et l'harmonisation des paramètres des tests AST (incluant le choix des agents antimicrobiens et les critères d'interprétation) sont essentielles ;
- ii) les méthodes d'AST normalisées, y compris les principales spécifications, et les critères d'interprétation doivent être clairement définis, documentés en détail, et utilisés par tous les laboratoires participants ;
- iii) toutes les méthodes d'AST doivent donner des résultats exacts et reproductibles ;
- iv) toutes les données doivent être rendues quantitativement ;
- v) la mise en place de laboratoires nationaux ou régionaux est essentielle pour la coordination des méthodologies d'AST, les interprétations et les techniques appropriées utilisées afin de garantir l'exactitude et la reproductibilité (par ex. les contrôles-qualités) ;
- vi) les laboratoires de microbiologie doivent mettre en œuvre et maintenir un programme formel de gestion de la qualité (voir Chapitre 1.1.3., « Gestion de la qualité dans les laboratoires de diagnostic vétérinaire ») ;
- vii) les laboratoires doivent être accrédités par un organisme indépendant et les méthodes AST doivent être réalisées dans le cadre de cette accréditation. L'organisme accréditeur doit être au niveau des normes du Laboratory Accreditation Cooperation [ILAC]) acceptées internationalement et des lignes directrices concernant les normes utilisées pour l'accréditation. Les normes d'accréditation utilisées doivent comprendre la participation à des programmes externes de comparaison des compétences ;
- viii) des souches spécifiques de bactéries de référence/de contrôle-qualité sont essentielles pour la mise en place des contrôles-qualités intra et inter-laboratoires, la gestion de la qualité et les programmes de comparaison des compétences.

2. Choix des antimicrobiens pour les essais et présentation des résultats

Il peut être difficile de choisir les antimicrobiens appropriés pour un AST en raison du grand nombre d'agents antimicrobiens disponibles. Les lignes directrices suivantes devraient être prises en compte :

- i) Le groupe d'experts FAO/OIE/OMS sur les antimicrobiens à usage non-humain et la résistance antimicrobienne recommande la création d'une liste des antimicrobiens vétérinaires et humains importants pour la sensibilité du test et la présentation des résultats.
- ii) Le choix des antimicrobiens les plus appropriés est une décision qui revient à chaque État Membre en association avec les institutions et organisations adaptées.

- iii) Les antimicrobiens de la même classe peuvent avoir des activités *in vitro* semblables contre des agents bactériens sélectionnés. Dans ce cas, un antimicrobien représentatif doit être choisi qui puisse prédire la sensibilité des autres membres de la classe.
- iv) Certains micro-organismes peuvent être intrinsèquement résistants à une classe particulière d'antimicrobiens ; il n'est donc pas nécessaire de tester certains agents pour leur activité *in vitro*, d'autant que cela peut conduire à de fausses interprétations. Ce type de résistance intrinsèque doit être recherché pour les micro-organismes soit dans la littérature scientifique soit en pratiquant des tests.
- v) Le nombre d'antimicrobiens à tester doit être limité afin de garantir la pertinence de l'AST et son aspect pratique.

Il est recommandé de réaliser une analyse périodique des micro-organismes qui sont classiquement réputés sensibles à certains agents antimicrobiens pour vérifier qu'aucune nouvelle résistance inattendue n'est détectée. Une nouvelle résistance peut aussi être suspectée à la suite d'une faible réponse à un traitement antimicrobien classique.

3. Méthodologies des tests de sensibilité aux antimicrobiens

Les conditions suivantes doivent être respectées :

- i) les bactéries soumises à l'AST doivent être isolées de cultures pures issues de l'échantillon testé ;
- ii) il convient d'utiliser des méthodes de référence normalisées pour l'identification de telle sorte que les bactéries en question soient identifiées correctement et avec régularité au niveau du genre et/ou de l'espèce ;
- iii) les isolats bactériens considérés comme les plus importants et un échantillon des autres isolats doivent être conservés pour de futures analyses (soit par lyophilisation ou conservation cryogénique entre -70 °C et -80 °C).

Les facteurs suivants influençant les méthodes d'AST doivent être déterminés, optimisés et documentés dans une procédure opératoire normalisée détaillée :

- i) lorsque la bactérie a été isolée en culture pure, la concentration optimale de l'inoculum doit être déterminée pour obtenir une sensibilité précise des résultats. Les bactéries ou les autres micro-organismes utilisés dans l'AST doivent provenir d'une culture fraîche ;
- ii) la composition et la préparation de la gélose et du bouillon de culture utilisés (par ex. pH, cations, thymidine ou thymine, utilisation de milieu supplémenté). La performance et la stérilité des milieux utilisés pour les tests doivent être déterminées et documentées ainsi que les procédures suivies ;
- iii) le contenu de l'antibactérien dans le support (antibiotiques utilisés dans les plaques de micro-titrage, disque, barrette, comprimé) ;
- iv) la composition des solvants et des diluants pour la préparation des solutions stock d'antibactérien ;
- v) la croissance et les conditions d'incubation (durée, température, atmosphère ex : CO₂) ;
- vi) l'épaisseur de la gélose ;
- vii) nombre des concentrations testées en bouillon et dans les dilutions de gélose ;
- viii) les témoins à employer, y compris les références des micro-organismes utilisés ;
- ix) les critères d'interprétation ultérieurs.

Pour ces raisons, un accent particulier doit être porté à l'emploi de procédures documentées et de méthodes validées et bien documentées, puisqu'une reproductibilité suffisante peut uniquement être atteinte par l'utilisation d'une telle méthodologie.

4. Sélection de méthodologies des essais d'antibiorésistance

La sélection d'une méthodologie d'AST peut être basée sur les facteurs suivants :

- i) facilité de réalisation ;
- ii) flexibilité ;

- iii) adaptabilité à des systèmes automatisés ou semi-automatisés ;
- iv) coût ;
- v) reproductibilité ;
- vi) fiabilité ;
- vii) précision ;
- viii) les micro-organismes et les antimicrobiens particulièrement intéressants pour le pays membre de l'OIE concerné ;
- ix) les données disponibles sur la validation concernant la gamme des micro-organismes dont la sensibilité doit être testée.

5. Méthodes pour l'essai de sensibilité aux antimicrobiens

Les 3 méthodes suivantes sont les seules qui fournissent des résultats reproductibles et répétables quand elles sont réalisées correctement (14, 15) :

- i) diffusion en disque,
- ii) dilution en bouillon,
- iii) dilution en gélose.

a) Méthode de la diffusion en disque

La diffusion en disque se réfère à la diffusion d'un agent antimicrobien d'une concentration spécifique à partir de disques, tablettes ou bandes, dans le milieu de culture solide, qui a été ensemencé avec l'inoculum choisi et isolé en culture pure (voir section 3.i). La diffusion en disque est basée sur la détermination d'une zone d'inhibition proportionnelle à la sensibilité bactérienne à l'antimicrobien présent dans le disque.

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de culture ensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque d'antimicrobien est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai. Généralement, plus la zone d'inhibition est importante, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne des organismes est faible. Cependant, cela dépend de la concentration d'antibiotique contenue dans le disque et de sa diffusibilité.

Note : Les essais de diffusion en disque qui sont basés uniquement sur la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition en négligeant la taille de la zone d'inhibition ne sont pas acceptables pour les méthodologies AST.

• Intérêts pour l'utilisation de la méthode de diffusion par disque

La diffusion en disque est facile à mettre en œuvre, reproductible et ne nécessite pas d'équipement onéreux. Ses principaux avantages sont :

- i) un faible coût ;
- ii) une facilité de modification des disques antimicrobiens si nécessaire ;
- iii) elle peut être utilisée comme test de tri lorsqu'il y a un grand nombre d'isolats ;
- iv) elle peut identifier un sous-groupe d'isolats destinés à des tests ultérieurs par d'autres méthodes, telle que la détermination de la CMI.

La mesure manuelle des zones de d'inhibition peut prendre du temps. Les dispositifs automatisés avec zone de lecture sont disponibles et peuvent être intégrés avec le rapport de laboratoire et les systèmes de manipulation de données. Les disques devraient être distribués également de sorte que les zones d'inhibition autour des disques antimicrobiens dans l'essai de diffusion en disque ne se chevauchent pas et qu'ainsi la zone d'inhibition puisse être déterminée. Généralement cela peut être effectué si les disques sont distants d'au moins 24 mm de centre à centre, bien que cela dépende de la concentration du disque et de la capacité de l'antimicrobien à diffuser dans la gélose.

b) Méthodes de dilutions en bouillon et gélose

Le but des méthodes de dilution en bouillon et gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI, habituellement exprimée en mg/ml ou mg/litre). Cependant, la CMI ne représente pas toujours une valeur absolue. La « véritable » CMI est un point entre la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie et la plus basse concentration suivante de l'essai. Les déterminations des CMI par la méthode des dilutions en série présentent donc une variation d'une dilution inhérente à la méthode.

Les gammes antimicrobiennes doivent entourer à la fois les critères interprétatifs (sensible, intermédiaire et résistant) pour une combinaison bactérie/antimicrobien spécifique, et les témoins qualité de référence des organismes appropriés.

Les méthodes de sensibilité antimicrobienne en dilution semblent être plus reproductibles et quantitatives que la diffusion en disque en gélose. Cependant, des antibiotiques sont habituellement testés en dilutions doublantes, qui peuvent donner des résultats inexacts de CMI.

Tout laboratoire qui prévoit d'employer une méthode de dilution et de préparer ses propres réactifs et dilutions d'antibiotiques doit avoir la capacité d'obtenir, préparer et maintenir les solutions stocks appropriées de catégories de réactifs antimicrobiens et de produire des dilutions de travail de façon régulière. Il est alors essentiel que de tels laboratoires fassent appel à des organismes de contrôle-qualité (voir ci-dessous) afin d'assurer l'exactitude et l'étalonnage de leurs procédures.

• Dilution en bouillon

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien (habituellement dilutions en série de 2 en 2) dans un milieu liquide de composition prédéterminée et documentée. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml (macrodilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration (microdilution). De nombreuses plaques de microtitration contenant des antibiotiques pré dilués dans les puits sont disponibles dans le commerce. L'utilisation de lots identiques de plaques de microdilution peut permettre de réduire au minimum la variation qui peut apparaître en raison de la préparation et de la dilution des antimicrobiens provenant de différents laboratoires. L'utilisation de ces plaques avec un protocole documenté, y compris les précisions sur les micro-organismes de référence approprié, peut faciliter la comparaison des résultats entre laboratoires.

Étant donné que la plupart des essais antimicrobiens de microdilution en bouillon sont préparés commercialement, cette méthode est moins flexible que la dilution en gélose ou que la diffusion en disque concernant l'ajustement aux besoins de changements du programme de surveillance/contrôle.

Puisque l'achat de l'équipement et des gammes d'antimicrobiens peut être coûteux, cette méthodologie peut ne pas être réalisable dans certains laboratoires.

• Dilution en gélose

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélifié à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte. Ces résultats sont souvent considérés comme les plus fiables pour la détermination d'une CMI pour la combinaison de l'essai bactérie/antimicrobien.

Les avantages de la dilution en gélose comprennent :

- i) la capacité de tester plusieurs bactéries sur le même ensemble de boîtes de gélose en même temps (à l'exception des bactéries envahissantes) ;
- ii) le potentiel d'améliorer l'identification des points finaux de la CMI et de développer la gamme de concentration antibiotique ;
- iii) la possibilité de semi-automatiser la méthode en utilisant un appareil de réplique des inoculum. Des appareils de réplique des inoculum sont disponibles commercialement et ils peuvent transférer entre 32 et 36 inoculum bactériens différents sur chaque boîte de gélose.

La méthode de dilution en gélose présente aussi certains désavantages, par exemple :

- i) quand ils ne sont pas automatisés, ces tests sont très laborieux et exigent des ressources économiques et techniques importantes ;

- ii) une fois les boîtes préparées, elles doivent être utilisées dans la semaine ;
- iii) il n'est pas toujours facile de lire les points finaux et la pureté de l'inoculum n'est pas facile à évaluer.

La dilution en gélose est souvent recommandée comme méthode normalisée d'AST pour des organismes à croissance lente (8), tels que les anaérobies, les genres *Helicobacter* et *Campylobacter*.

c) Autres AST bactériens et essais spécifiques d'antibiorésistance

Les CMI antimicrobiennes des bactéries peuvent aussi être déterminées en utilisant des bandes de gradient disponibles dans le commerce et qui diffusent une concentration antibiotique prédéterminée. Cependant, l'utilisation des bandes de gradient peut être très coûteuse et des anomalies de CMI peuvent être trouvées lorsque l'on analyse certaines combinaisons bactérie/antimicrobien, en comparaison avec les résultats obtenus en dilution en gélose (2, 5).

Indépendamment de la méthode AST employée, les procédures devraient être documentées en détail pour garantir des résultats fiables et reproductibles, et des souches de références devraient toujours être examinées chaque fois qu'un AST est exécuté afin de garantir l'exactitude et la validité des données.

Le choix approprié de l'AST dépendra finalement des caractéristiques de croissance de la bactérie en question. Dans des circonstances spéciales, les nouvelles méthodes d'analyse et essais peuvent être plus appropriées pour la détection de phénotypes particuliers de résistance. Par exemple, les essais chromogéniques à base de céphalosporine (8) (par exemple nitrocefine) peuvent fournir des résultats plus fiables et plus rapides pour la recherche de la bêta-lactamase chez certaines bactéries, tandis que la résistance de *Staphylococcus* spp. à la clindamycine peut être détectée par la méthode des disques en utilisant des disques standards d'érythromycine et de clindamycine en position adjacente et en mesurant les diamètres des zones d'inhibition qui en résultent (par ex. : D-zone) (18).

De même, la bêta-lactamase (ESBL, *Extended-Spectrum Beta-Lactamase*) (8) à activité à large spectre chez certaines bactéries peut également être détectée en employant des méthodes de référence d'essais de sensibilité de diffusion par disque en utilisant les céphalosporines spécifiques (cefotaxime et ceftazidime) en association avec un inhibiteur de bêta-lactamase (acide clavulanique) et en mesurant les zones résultantes de l'inhibition. De plus, la résistance au chloramphénicol attribuée à la production de la transférase d'acétyle de chloramphénicol peut être détectée dans quelques bactéries par l'intermédiaire d'essais rapides en tubes ou sur papier filtre dans un délai de 1 à 2 h (8). La protéine qui se fixe à la pénicilline, PBP 2a (*penicillin-binding protein 2a*), peut aussi être détectée chez les staphylocoques résistants à la méthicilline en utilisant un test d'agglutination des billes de latex (13).

d) Tendances futures dans la détection de la sensibilité ou de la résistance aux antimicrobiens

Les approches génotypiques pour la détection des gènes de résistance aux antimicrobiens ont été encouragées afin d'améliorer la rapidité et la précision des essais de sensibilité (3). De nombreuses épreuves basées sur l'ADN sont en cours de développement pour détecter la résistance des bactéries au niveau génétique. L'approche la plus récente et peut être la plus perfectionnée est la prédiction de phénotypes résistants grâce à l'identification et la caractérisation de gènes connus qui codent les mécanismes spécifiques de résistance.

Les méthodes basées sur la génomique comparative, les sondes, les micro-puces, l'amplification des acides nucléiques (par ex. amplification en chaîne par polymérase [PCR]) et le séquençage de l'ADN semblent prometteuses pour améliorer la sensibilité, la spécificité et la rapidité d'exécution dans la détection des gènes de résistance (3, 4, 10). Les méthodes génotypiques ont été utilisées avec succès pour compléter les méthodes phénotypiques AST traditionnelles pour des micro-organismes comme les staphylocoques résistants à la méthicilline, les entérocoques résistants à la vancomycine et pour la détection de mutations de résistance à la fluoroquinolone (3, 4, 10). Des techniques de PCR ont été décrites pour les gènes codant la bêta-lactamase, les enzymes inactivant les aminoglycosides et les gènes de reflux de la tétracycline (4, 10).

Les innovations technologiques dans le domaine des diagnostics basés sur l'ADN devraient permettre la détection des gènes des résistances multiples et/ou les variants pendant le même test. Le développement de méthodes rapides d'identification et d'estimation de la résistance génotypique devrait réduire l'apparition de résistances aux antimicrobiens en permettant l'utilisation de l'antimicrobien le plus approprié, quand une thérapie est commencée. Cependant, il convient encore de démontrer que les méthodes génétiques sont bien complémentaires des méthodes classiques d'AST.

En outre, les avancées technologiques pourraient permettre, grâce à des sondes, d'identifier dans les espèces bactériennes un grand nombre de gènes de résistance rapidement et à un moindre coût. Cela procurerait des données pertinentes supplémentaires pour les programmes de surveillance et de suivi.

Cependant, en dépit de l'arrivée des tests génotypiques, les méthodes d'AST phénotypiques seront encore nécessaires dans un proche avenir pour détecter l'apparition de nouvelles résistances parmi les agents bactériens pathogènes.

6. Seuils de sensibilité antibactérienne et critères des zones d'inhibition

L'objectif d'une AST *in vitro* est de prévoir la manière dont un agent pathogène bactérien peut répondre à un agent antibactérien *in vivo*. Les résultats obtenus par les essais bactériens *in vitro* de sensibilité antibactérienne, quelques soit la méthode utilisée de diffusion sur disque ou de dilution, sont généralement interprétés et rapportés comme résistants, sensibles ou intermédiaires à l'action d'un antibactérien particulier. Aucune formule pour déterminer le seuil optimal n'a pu être établie. Le procédé comprend une revue des données existantes et est influencé par la subjectivité des personnels chargés de choisir un seuil approprié.

En règle générale, les seuils de sensibilité antibactérienne sont établis par des organisations nationales de normalisation, des sociétés professionnelles et des agences de réglementation. Les documents adéquats doivent être consultés. Cependant, il peut y avoir des différences notables dans les seuils pour le même agent antibactérien selon les pays en raison de différences entre les organisations chargées d'établir les normes et les agences de contrôle, et aussi du fait de décisions nationales ou régionales sur les systèmes de dosage (6).

Comme mentionné précédemment, les résultats des essais d'antibiorésistance doivent être enregistrés quantitativement :

- i) par la distribution des CMI en milligrammes par litre ou mg/ml,
- ii) ou par les diamètres de zone d'inhibition en millimètres.

Les deux facteurs primaires suivants permettent à une bactérie d'être considérée comme sensible ou résistante à un agent antibactérien :

- i) le développement et l'établissement d'échelles de contrôle-qualité (8), par l'utilisation de l'essai de diffusion lorsque c'est possible et de l'essai de dilution, pour les microorganismes de référence de contrôle-qualité.

L'établissement d'échelles de contrôle-qualité est essentiel pour la validation des résultats de la méthode spécifique d'AST utilisée. La gamme d'interprétation admise pour le contrôle-qualité des microorganismes de référence doit être établie avant de déterminer les seuils de sensibilité ou de résistance. L'utilisation de microorganismes de référence est une activité du contrôle et de l'assurance qualité.

- ii) La détermination des critères appropriés d'interprétation en vue de la détermination des seuils (8).

Cela implique la génération de 3 types distincts de données :

- la distribution des CMI de microorganismes pertinents ;
- les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de l'agent antibactérien ;
- les résultats des essais cliniques et des expériences.

L'interprétation des données implique la création d'un indice de dispersion de la distribution de la population bactérienne (représentatif des espèces bactériennes), en traçant une courbe de la zone d'inhibition en fonction du logarithme en base 2 de la CMI pour chaque agent pathogène bactérien. La sélection des points de césure est ensuite basée sur de multiples facteurs, incluant l'analyse de la droite de régression qui corrèle les CMI et les diamètres des zones d'inhibition, les distributions des populations bactériennes, la limite du taux d'erreur, la pharmacocinétique, et enfin, la vérification clinique.

Le développement d'un concept connu comme « seuil microbiologique », ou « seuils épidémiologiques » qui est basé sur les distributions de population d'espèces bactériennes spécifiques testées, peut être plus approprié à des programmes de surveillance antimicrobienne. Dans ce cas, les isolats bactériens qui dévient des populations normales sauvages sensibles seront désignés comme résistants, et tout changement de sensibilité de la combinaison antimicrobien spécifique / bactérie pourra être alors surveillé (12). L'enregistrement des données sur la sensibilité quantitative est d'un grand intérêt car ces données peuvent être analysées en fonction du seuil clinique ou du seuil épidémiologique.

7. Lignes directrices pour les essais d'antibiorésistance

Un nombre de normes et de lignes directrices est actuellement disponible au niveau mondial pour les essais d'antibiorésistance et les critères d'interprétation qui en découlent (6). On peut trouver notamment parmi d'autres celles publiées par :

L'Institut pour les Laboratoires Cliniques et les normes (CLSI/NCCLS *Committee for Clinical Laboratory Standards*, États-Unis),

La Société Britannique pour la Chimiothérapie Antimicrobienne (*British Society for Antimicrobial Chemotherapy*, BSAC, Royaume Uni),

Le Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie (CASFM, France),

Le Groupe de Référence Suédois pour les Antibiotiques (*Swedish Reference Group for Antibiotics*, SIR, Suède),

L'Institut Allemand pour la Normung (*Deutsches Institut für Normung*, DIN, Allemagne),

La Société Japonaise de Chimiothérapie (*Japanese Society for Chemotherapy*, JSC, Japon),

Le Werkgroep richtlijnen gevoeligheidsbepalingen (WRG system, Pays-Bas).

Actuellement, seul le CLSI/NCCLS a développé des protocoles pour les essais d'antibiorésistance/sensibilité de bactéries d'origine animale et la détermination de critères d'interprétation (8). Toutefois, des protocoles et des lignes directrices, pour les essais d'antibiorésistance concernant des espèces de bactéries identiques et qui sont responsables d'infections chez l'homme, sont disponibles auprès d'un certain nombre d'organisations normatives et de sociétés de professionnelles (voir la liste ci-dessus). Il est possible que de telles lignes directrices soient adoptées pour les essais d'antibiorésistance concernant les bactéries d'origine animale, mais chaque pays doit évaluer ses propres normes d'AST et lignes directrices. De plus, des efforts vers la normalisation et l'harmonisation des seuils de sensibilité/résistance à une échelle internationale sont en cours. Ces efforts ont tout d'abord porté sur l'adoption de normes et de lignes directrices de la CLSI, qui fournit les laboratoires en méthodes de référence et en valeurs de contrôle-qualité permettant des comparaisons des méthodes d'AST et des données obtenues (8, 16). Pour les Pays membres de l'OIE qui n'ont pas de méthodes AST de référence, l'adoption des lignes directrices et des normes de la CLSI serait une étape initiale vers l'acceptation de méthodes appropriées et l'harmonisation.

Comme première étape vers la comparaison des données de contrôle et de surveillance, les Pays membres doivent être encouragés à travailler pour la mise en place de programmes harmonisés et normalisés (14). Sans quoi, des données de pays utilisant des méthodes différentes et des schémas de travail pourront ne pas être directement comparables (7, 14). Malgré cela, les données collectées au cours du temps dans un pays donné peuvent au moins permettre la détection de l'émergence d'une résistance antimicrobienne ou une tendance dans la prévalence de sensibilité/résistance dans ce pays particulier (11). Cependant, si les résultats effectués avec les différentes méthodes AST sont destinés à être présentés point par point, alors la possibilité de comparer les résultats doit être démontrée et un consensus pour l'interprétation réalisé.

Note : Cela sera mieux réalisé par l'utilisation de méthodes AST documentées, précises et fiables conjointement avec la surveillance de l'efficacité de l'AST avec des microorganismes de référence définis parmi les laboratoires participants.

8. Possibilité de comparer les résultats

Pour déterminer la « comparabilité » des résultats provenant de systèmes différents de surveillance, les résultats doivent être donnés quantitativement avec les informations sur les performances des méthodes, les organismes de références et les antimicrobiens.

Les données de l'AST, à savoir les rapports permanents et cumulés des profils de sensibilité (antibiogrammes) des microorganismes importants au plan clinique, devraient être enregistrées et analysées périodiquement (9). Les données doivent être présentées sous une forme claire et cohérente, afin que les nouveaux profils de résistance puissent être identifiés et que les anomalies découvertes soient confirmées ou infirmées. Ces données devraient être disponibles dans une banque de données centralisée et publiées tous les ans.

Les données cumulées de l'AST seront utiles au suivi des tendances de sensibilité/résistance dans une région sur le long terme et pour évaluer les effets des interventions appliquées dans le but de réduire la résistance aux antimicrobiens.

9. Contrôle-qualité et assurance qualité

Des systèmes adéquats de contrôle-qualité/assurance qualité doivent être établis dans les laboratoires réalisant l'AST :

- i) le contrôle-qualité concerne les techniques opérationnelles qui sont mises en œuvre pour garantir la précision et la reproductibilité de l'AST ;
- ii) l'assurance qualité.

Les éléments suivants doivent être surveillés :

- i) la précision de la procédure d'AST ;
- ii) l'exactitude de la procédure d'AST ;
- iii) la qualification, la compétence et l'expertise du personnel du laboratoire et de ceux qui interprètent les résultats, ainsi que des personnes impliquées dans les suivis de la résistance aux antimicrobiens ;
- iv) l'efficacité des réactifs utilisés de manière appropriée.

Les conditions suivantes doivent être respectées :

- i) Un suivi strict des techniques spécifiques et documentées en conjonction avec le contrôle-qualité (par ex. le contrôle des performances et autres critères pertinents) des milieux et des réactifs ;
- ii) La conservation des documents relatifs aux :
 - numéros des lots de tous les matériels et réactifs,
 - dates d'expiration de tous les matériels et réactifs,
 - études métrologiques périodiques des équipements,
 - spécifications importantes des performances de l'AST (résultats de référence, temps, température, etc.).
- iii) Les bactéries de référence appropriées doivent toujours être testées quelque soit la méthode AST utilisée ;
- iv) Les souches bactériennes de référence doivent être obtenues à partir d'une source fiable comme, par exemple, l'American Type Culture Collection (ATCC®), ou de sociétés commerciales fiables, ou d'institutions ayant démontré leur capacité à conserver et manipuler les micro-organismes correctement ;
- v) Les souches bactériennes de référence doivent être répertoriées et caractérisées avec des phénotypes de sensibilité antimicrobienne définis et stables. Les registres de ces bactéries de référence doivent comprendre les échelles de résistance et de sensibilité qui ont été établies vis-à-vis des antimicrobiens testés, et la méthode qui a été employée ;
- vi) Les laboratoires impliqués dans l'AST doivent utiliser les souches de référence appropriées dans tous les tests AST ;
- vii) Les souches de références doivent être conservées comme des cultures de stock à partir desquelles les cultures de travail sont dérivées et doivent être obtenues auprès de collections de cultures nationales ou internationales. Les souches bactériennes de référence doivent être conservées dans des laboratoires régionaux ou désignés comme centraux. Les « cultures de travail » ne doivent pas être repiquées d'un jour à l'autre car cela introduit un risque de contamination, et la méthode d'obtention des cultures de travail doit garantir que les « cultures stock » ne sont que rarement utilisées. Cela peut se faire en produisant une culture stock intermédiaire dérivée de la culture originale et qui servira à la production de cultures de travail au jour le jour ;
- viii) La méthode retenue pour l'analyse de l'ensemble de l'efficacité de chaque laboratoire doit tester les cultures de travail des bactéries de référence chaque jour où des essais d'antibiorésistance sont effectués.

Parce que cela n'est pas toujours pratique ou économique, la fréquence de tels tests de contrôle-qualité devrait être réduite si le laboratoire peut démontrer que les résultats des tests sur les bactéries de référence (selon la procédure d'antibiorésistance retenue) sont reproductibles. Si le laboratoire peut fournir la preuve de la reproductibilité des méthodes d'essai d'antibiorésistance utilisées, l'essai peut être effectué sur une base hebdomadaire. S'il apparaît des doutes sur la précision, la reproductibilité ou la validité de la méthode, il est de la responsabilité du laboratoire de déterminer la (les) cause(s) et de répéter les essais en utilisant les réactifs de référence. Selon la (les) cause(s), le test doit être redémarré sur une base quotidienne ou toute autre action corrective doit être entreprise ;
- ix) Les bactéries de référence doivent être testées chaque fois qu'un nouveau lot de milieu ou lot de plaque est utilisé et sur une base régulière en parallèle avec les souches bactériennes à tester ;

- x) Les problèmes de biosécurité adaptés doivent être abordés en obtenant et en diffusant les microorganismes aux laboratoires participants.

10. Test de compétence externe

Pour s'assurer qu'un résultat de sensibilité est précis, les Pays membres de l'OIE doivent initier un programme de tests de compétence inter-laboratoires. Le test de compétence externe peut être effectué sur une base nationale. Les laboratoires des Pays Membres sont aussi encouragés à participer à des comparaisons inter-laboratoires internationales (par ex. Enter-Net) (6). Toutes les espèces bactériennes soumises à l'AST doivent être incluses.

Les pays doivent employer ou établir des laboratoires nationaux ou de références qui sont responsables de :

- i) la surveillance des programmes d'assurance qualité des laboratoires participant à la surveillance de la résistance antimicrobienne ;
- ii) la caractérisation d'un ensemble de souches de référence et sa distribution à ces laboratoires ;
- iii) la création, la gestion et la distribution des échantillons utilisés dans les tests de compétence externe
- iv) la création d'une base de données centrale disponible sur internet (ex : European Antimicrobial Resistance Surveillance System [EARSS]) qui contient les différents profils de sensibilité/résistance pour chaque espèce bactérienne.

11. Conclusion

Bien qu'il existe une grande variété de méthodes, le but des essais *in vitro* de sensibilité des agents pathogènes aux antimicrobiens est le même : procurer une prédiction fiable sur la réponse vraisemblable de micro-organismes à une thérapie anti-microbienne chez un hôte infecté. Ce type d'informations aide le clinicien dans le choix d'un agent anti-microbien approprié, apporte des données pour la surveillance et sert de base à la mise au point de politiques d'utilisation des antimicrobiens.

Les essais *in vitro* de sensibilité aux antimicrobiens peuvent être réalisés selon de nombreuses technique, les plus fréquentes étant la diffusion en disque, la dilution en gélose, les dilutions (macro et micro) en bouillon et le test de concentration en bande (par ex : l'E test®). Chacune de ces procédures nécessite l'utilisation de conditions et de méthodes spécifiques, notamment les milieux, les conditions et les durées d'incubation, et l'identification des organismes pour le contrôle-qualité ainsi que de leur gamme QC spécifique. Il est important que les méthodes AST donnent des résultats reproductibles dans les essais quotidiens au laboratoire et que les données soient comparables avec celles obtenues par une méthode de référence (« *gold standard* »). En l'absence de méthode normalisée ou de protocole de référence, il est impossible de comparer les résultats de sensibilité/résistance aux anti-microbiens obtenus par différents laboratoires.

L'approche génotypique pour la détection des gènes de résistance aux antibiotiques est recommandée pour accélérer et améliorer l'exactitude des tests. En outre, les avancées technologiques nouvelles pourrait faciliter le dépistage rapide et peu coûteux par des sondes d'un grand nombre de gènes de résistance dans les bactéries, apportant de ce fait des données pertinentes supplémentaires au programmes de surveillance. Cependant, en dépit de l'intérêt pour les tests génotypiques, les méthodes d'AST normalisées seront encore nécessaires pour détecter l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance parmi les agents pathogènes bactériens.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANTHONY F., ACAR J., FRANKLIN A., GUPTA R., NICHOLLS T., TAMURA Y., THOMPSON S., THRELLFALL E.J., VOSE D., VAN VUUREN M. & WHITE D.G. (2001). Antimicrobial resistance: responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 829–839.
2. BROWN D.F. & BROWN L. (1991). Evaluation of the E-test, a novel method of quantifying antimicrobial activity. *J. Antimicrob. Chemother.*, **26**, 185–190.
3. CAI H.Y., ARCHAMBAULT M., GYLES C.L. & PRESCOTT J.F. (2003). Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications. *Anim. Health Rev.*, **4**, 73–93.
4. CHEN S., ZHAO S., McDERMOTT P.F., SCHROEDER C.M., WHITE D.G. & MENG J. (2005). A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Probes*, **19**, 195–201.

5. GE B., BODEIS S., WALKER R.D., WHITE D.G., ZHAO S., McDERMOTT P.F. & MENG J. (2002). Comparison of Etest and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **50**, 487–494.
6. KAHLMETER G., BROWN D.F.J., GOLDSTEIN F.W., MACGOWAN A.P., MOUTON J.W., OSTERLUND A., RODLOFF A., STEINBAKK M., URBASKOVA P. & VATOPOULOS A. (2003). European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, **52**, 145–148.
7. LEEGARD T.M., CAUGANT D.A., FROHOLM L.O. & HOIB, E.A. (2000). Apparent differences in antimicrobial susceptibility as a consequence of national guidelines. *Clin. Microbiol. Inf. Dis.*, **6**, 290–293.
8. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) (2002). Document M31-A2. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard, Second Edition. NCCLS document M31-A2. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 80 pp.
9. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) (2002). Document M39-A. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; Approved Guideline. NCCLS document M39-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 30 pp.
10. PERRETEY V., VORLET-FAWER L., SLICKERS P., EHRLICH R., KUHNERT P. & FREY J. (2005). Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2291–2302.
11. PETERSEN A., AARESTRUP F.M., HOFSHAGEN M., SIPILA H., FRANKLIN A. & GUNNARSSON E. (2003). Harmonization of antimicrobial susceptibility testing among veterinary diagnostic laboratories in five Nordic countries. *Microb. Drug Resist.*, **9**, 381–388.
12. RINGERTZ S., OLSSON-LILJEQUIST B., KAHLMETER G. & KRONVALL G. (1997). Antimicrobial susceptibility testing in Sweden II. Species-related zone diameter breakpoints to avoid interpretive errors and guard against unrecognised evolution of resistance. *Scand. J. Infect. Dis. (Suppl.)*, **105**, 8–12.
13. STEPANOVIC S., HAUSCHILD T., DAKIC I., AL-DOORI Z., SVABIC-VLAHOVIC M., RANIN L. & MORRISON D. (2006). Evaluation of phenotypic and molecular methods for detection of oxacillin resistance in members of the *Staphylococcus sciuri* group. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 934–937.
14. THRELFALL E.J., FISHER I.S.T., WARD L., TSCHAPE H. & GERNER-SMIDT P. (1999). Harmonization of antibiotic susceptibility testing for *Salmonella*: Results of a study by 18 national reference laboratories within the European Union-funded Enter-Net group. *Microb. Drug Resist.*, **5**, 195–199.
15. WALKER R.D. (2000). Antimicrobial susceptibility testing and interpretation of results. In: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D., eds. Ames, IA, Iowa State University Press, 12–26.
16. WHITE D.G., ACAR J., ANTHONY F., FRANKLIN A., GUPTA R., NICHOLLS T., TAMURA Y., THOMPSON S., THRELFALL J.E., VOSE D., VAN VUUREN M., WEGENER H., & COSTARRICA L. (2001). Standardisation and harmonisation of laboratory methodologies for the detection and quantification of antimicrobial resistance. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 849–858.
17. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2003). OIE International Standards on Antimicrobial Resistance. OIE, Paris, France.
18. ZELAZNY A.M., FERRARO M.J., GLENNEN A., HINDLER J.F., MANN L.M., MUNRO S., MURRAY P.R., RELLER L.B., TENOVER F.C. & JORGENSEN J.H. (2005). Selection of strains for quality assessment of the disk induction method for detection of inducible clindamycin resistance in staphylococci: a CLSI collaborative study. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2613–2615.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour l'antibiorésistance (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

LES BIOTECHNOLOGIES DANS LE DIAGNOSTIC DES MALADIES INFECTIEUSES ET LE DÉVELOPPEMENT DES VACCINS

INTRODUCTION

Les méthodes de biologie moléculaire ont de plus en plus d'applications dans le diagnostic des maladies infectieuses et le développement de vaccins. Avant d'être largement utilisées, les méthodes développées nécessitent d'être simples, sans risque, sensibles, reproductibles et éventuellement automatisables pour faciliter le criblage d'un grand nombre d'échantillons.

Les objectifs de ce chapitre sont de fournir des considérations générales sur le sujet pour les non-spécialistes. Deux numéros spéciaux de la Revue Scientifique et Technique de l'OIE sont dédiés aux biotechnologies et au diagnostic des maladies animales ; ils pourront être consultés pour une information plus exhaustive (182, 183). Ce qui suit n'est qu'un aperçu des domaines présentés dans ce chapitre.

A. Détection des acides nucléiques

1. Réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) et PCR en temps réel ;
2. Diagnostic par polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et approches liées basées sur l'ADN ;
3. Diagnostic à l'aide de sondes nucléiques et de la technique des micropuces à ADN ;
4. Extraction des acides nucléiques.

B. Détection des protéines

1. Immunohistochimie ;
2. Immunotransfert ;
3. Méthode immuno-enzymatique avec capture d'antigène (ELISA) ;
4. Immunochromatographie ;
5. Protéomique.

C. Détection des anticorps

1. ELISA de compétition (c-ELISA) ;
2. Production d'antigènes par la technologie de l'ADN recombiné.

D. Vaccins

1. Vaccins avec délétion de gènes – bactéries ;
2. Vaccins marqueurs et épreuves de diagnostic associées ;
3. Vaccins à virus vectorisés ;
4. Vaccins à base d'ADN ;
5. Autres développements en technologie vaccinale.

E. Les nanotechnologies dans le domaine du diagnostic et du développement des vaccins

1. Diagnostic
2. Développement de vaccins

A. DÉTECTION DES ACIDES NUCLÉIQUES

1. La réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) et PCR en temps réel

La PCR utilise les propriétés répliquatives naturelles de l'ADN pouvant conduire à de grande quantité *in vitro* d'une séquence désirée d'ADN à partir d'un mélange complexe de séquences hétérogènes (138). La PCR peut amplifier plusieurs millions de fois des copies d'une région sélectionnée d'ADN d'une taille de 50 à plusieurs milliers de paires de bases. Une discussion détaillée de la méthodologie et des applications de la PCR est donnée dans la référence de Mullis *et al.* (99).

L'amplification de l'ADN par PCR est réalisée *via* une succession cyclique d'incubations à différentes températures. L'ADN cible est d'abord dénaturé par la chaleur pour séparer les deux brins complémentaires afin d'obtenir une matrice simple brin. Des amorces spécifiques (courtes molécules synthétiques d'ADN complémentaires des deux brins d'ADN) sont ensuite hybridées à une matrice simple brin à basse température et sont prolongées avec une ADN polymérase à une température intermédiaire. Lorsque la polymérase a synthétisé un nouveau brin d'ADN, le produit est séparé de la matrice par chauffage à une température plus élevée. Ces étapes suivent des cycles qui sont répétés 20 à 40 fois, permettant ainsi l'amplification de l'ADN cible. La clé de l'amplification géométrique de la séquence d'ADN cible est au niveau de la sélection des oligonucléotides qui, une fois prolongés, vont générer des sites complémentaires pour les oligonucléotides et permettre une hybridation au cours d'un nouveau cycle. Pour détecter l'ARN (par ex., l'ARN viral), une copie d'ADN complémentaire (ADNc) doit être d'abord réalisée en utilisant une transcriptase inverse (RT). L'ADNc agit ensuite comme une empreinte pour l'amplification par PCR. Cette technique est appelée RT-PCR.

Tout produit de PCR généré a, par définition, une taille caractéristique. Son identité est généralement confirmée en utilisant des sondes ADN (voir ci-dessous) ou des produits de digestion d'enzymes de restriction qui peuvent être utilisés pour fournir des RFLPs (voir ci-dessus). Plus communément, depuis l'introduction de techniques automatisées de séquençage en cycles, l'identification est réalisée *via* un séquençage direct des produits de PCR. Par exemple, le séquençage a été utilisé pour le typage de la virulence du virus de l'influenza aviaire de type A, pour lequel des motifs de structure au niveau du site de clivage du gène de l'hémagglutinine sont associés à des marqueurs de haute pathogénicité chez le poulet (69). La sensibilité de la PCR peut être augmentée par l'utilisation d'une seconde série d'oligonucléotides pour amplifier un sous-fragment du produit d'amplification initial. Cette méthode est communément appelée PCR nichée et a été utilisée pour détecter de faibles taux d'*Anaplasma marginale* chez des bovins infectés permanents (162). Cependant, l'utilisation de la PCR nichée peut augmenter le taux de faux résultats positifs.

La PCR est une méthode hautement sensible pour détecter des agents infectieux dans les tissus de l'hôte et chez les vecteurs, même lorsque seulement un petit nombre de cellules de l'hôte sont infectées. La PCR peut cibler et amplifier une séquence d'un gène qui a été intégrée dans le génome de cellules infectées de l'hôte. La réaction peut aussi être dirigée pour amplifier des séquences géniques virales non intégrées. Il est possible d'utiliser la PCR pour rechercher des contaminants dans les lots de vaccins. Cependant, elle ne permet pas de différencier les organismes vivants des organismes morts ou des fragments incomplets d'ADN génomique, et cela peut rendre difficile l'interprétation des résultats et affecter l'applicabilité de la PCR pour cette fonction.

La PCR peut se révéler très utile dans le diagnostic des infections chroniques persistantes, comme celles provoquées par les rétrovirus (virus de la leucose bovine, virus de l'encéphalite/arthritis caprine, etc.). Ces maladies présentent des problèmes graves en termes de diagnostic et de prévention puisque les animaux infectés sont une source constante d'agents transmissibles.

Quand la PCR est utilisée à des fins diagnostiques, une grande attention doit être portée pour éviter une contamination des échantillons, du fait de la sensibilité extrême de la technique, qui peut donner facilement des faux résultats positifs. Des études inter-laboratoires ont montré que des échantillons positifs sont toujours détectés, mais de faux positifs sont fréquemment obtenus avec des échantillons négatifs connus. Ceci indique la présence continue de problèmes de contamination (143). Des systèmes ont été développés pour résoudre ce problème comme le système dUTP-UNG (d-uracile triphosphate et uracile-N-glycosylase). Ces systèmes utilisent une réaction enzymatique pour dégrader spécifiquement les produits de PCR à partir d'une amplification préalable (dans laquelle du dUTP a été incorporé) sans dégrader les matrices d'acides nucléiques initiales (32). Ceci, bien sûr, n'exclue pas la contamination d'échantillons par des virus extérieurs. Une nouvelle génération de postes de travail robotisés est maintenant disponible et des réactions de PCR peuvent être programmées avec un tube unique ouvert une seule fois. Cela réduit nettement les risques de contamination. Il est également important de contrôler les résultats négatifs qui pourraient être dus à la présence de substances pouvant interférer avec la réaction dans le mélange réactionnel de la PCR ou dans l'échantillon du patient. Ce contrôle peut s'effectuer par l'introduction d'une matrice connue pour la production d'un produit de PCR (32). La prise en compte de ces précautions permet l'utilisation de PCR comme une option réaliste pour le diagnostic.

Afin d'augmenter son utilité dans les diagnostics vétérinaires et pour l'identification des agents pathogènes, l'épreuve de PCR a été très largement modifiée au cours de ces dernières années. La PCR utilisant des amorces largement conservées est destinée à l'identification des classes d'agents pathogènes. Le meilleur exemple en est l'utilisation des séquences du gène 16S de l'ARNr, qui est un gène bien conservé par l'évolution dans les espèces bactériennes (58). En prenant des amorces complémentaires des régions conservées de la séquence, il est possible de déterminer la présence de n'importe quelle classe recherchée dans un échantillon. Il convient de noter qu'un résultat positif en PCR doit être précisé ultérieurement par hybridation avec des sondes spécifiques d'espèce, par une analyse par digestion avec des enzymes de restriction ou par séquençage. De la même façon, la PCR « consensuelle » est mise au point pour utiliser des amorces dégénérées qui ciblent des régions ou des motifs d'un groupe d'agents pathogènes apparentés (173). Ainsi l'utilisation d'amorces dégénérées ayant pour cible les régions conservées du gène de la ADN-polymérase des herpèsvirus, a-t-elle permis l'identification de nombreux herpèsvirus non connus chez diverses espèces animales (46, 82). En revanche, la PCR multiplex est mise au point afin d'utiliser deux (ou plus) paires d'amorces dirigées vers des séquences uniques spécifiques d'un agent pathogène au cours d'une seule réaction pour la détection simultanément de plusieurs agents pathogènes présentant un intérêt (47). La PCR multiplex présente l'avantage d'un haut niveau de sensibilité et de spécificité. Cependant, il a été signalé que l'usage de la « multiplicité » risquait de réduire la sensibilité comparé à la PCR unique, du fait de phénomènes de compétition. Il convient de garder cette remarque à l'esprit lorsqu'une épreuve très sensible est recherchée.

Les méthodes classiques de PCR pour le diagnostic d'agents pathogènes, bactérien et viral, sont maintenant obsolètes et, dans quelques cas, remplacées par des PCR en temps réel. Les PCR en temps réel contrôlent l'accumulation des produits de PCR pendant la réaction d'amplification, permettant ainsi l'identification des cycles pendant lesquels la génération de produit de PCR presque logarithmique est obtenue. En d'autres termes, la technique peut être utilisée pour quantifier de manière fiable l'ADN ou l'ARN contenu dans un échantillon donné. Par opposition à la PCR conventionnelle, la PCR en temps réel demande moins de manipulations, est plus rapide que les techniques de PCR conventionnelles, utilise des tubes fermés permettant ainsi de diminuer les risques de contaminations croisées, elle est plus sensible et spécifique, conservant ainsi un rendement de qualité et elle procure des informations quantitatives. Dans de nombreux cas, la PCR en temps réel a montré qu'elle est plus sensible que les méthodes de référence existantes (64, 179). Le développement récent de techniques et de machines à PCR en temps réel portables (132) ouvre la perspective intéressante d'utilisation de ces techniques pour des diagnostics rapides (moins de 2 h) de foyers sur le terrain.

La validation des techniques de PCR est décrite dans le Chapitre 1.1.5., « Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaîne par polymérase de PCR utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses ». Ce chapitre traite également des témoins internes qui garantissent la validité des résultats de la PCR.

2. Diagnostic par polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et approches liées basées sur l'ADN

Les épreuves sérologiques communément employées pour identifier des micro-organismes ne sont parfois pas suffisamment discriminantes pour distinguer des isolats d'agents pathogènes étroitement apparentés, qu'ils s'agissent de virus, de bactéries, de champignons ou de parasites. Une procédure basée sur l'ADN offrira la meilleure discrimination qui est souvent requise et un point de départ adéquat peut être l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RLFP).

L'approche par RLFP est basée sur le fait que les génomes d'agents pathogènes même étroitement apparentés sont définis par des variations de la séquence. C'est ainsi, le cas quand l'ordre linéaire des nucléotides adjacents comprenant la séquence de reconnaissance d'une enzyme de restriction spécifique dans un génome peut être absent dans le génome d'une souche ou d'un isolat étroitement apparenté.

En pratique la procédure de RFLP consiste en l'isolement de l'agent pathogène cible, en l'extraction de l'ADN ou de l'ARN (avec la transcription inverse en ADN) et ensuite en la digestion de l'acide nucléique avec l'un des groupes d'enzyme de restriction. Les fragments individuels de l'ADN digéré sont ensuite séparés sur un gel d'électrophorèse et visualisés par un marquage avec du bromure d'éthidium. Idéalement, chaque espèce révélera un profil unique, ou empreinte. Beaucoup d'enzymes de restriction différentes peuvent être prises en compte pour une nouvelle identification, si bien que les analyses de nombreuses empreintes moléculaires issues de digestions avec plusieurs enzymes de restrictions individuelles peuvent être effectuées et la combinaison du meilleur groupe de résultats permettra une différenciation complète entre espèces ou isolats. Un bon exemple de l'application de cette technique est la différenciation entre les biotypes des virus rabiques issus du chien ou des chauve-souris originaires d'Amérique Latine (89).

Une modification de la technique de base de RFLP est de plus grande utilité lorsqu'une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) est ajoutée en étape préliminaire. La méthode de PCR (décrite en détail dans la section 1 ci-dessus) est utilisée pour amplifier une région spécifique du génome (connue par le manipulateur

comme étant une séquence variable entre les agents pathogènes), qui sert ensuite d'empreinte ADN pour la technique de RFLP. Cette nouvelle combinaison (PCR-RFLP) offre une meilleure sensibilité pour l'identification d'agents pathogènes et elle est plus particulièrement utile lorsque l'agent pathogène est retrouvé en petit nombre ou s'il est difficile à cultiver, deux facteurs qui caractérisent le parasite protozoaire intestinal *Cryptosporidium* spp. La RFLP et, plus particulièrement, la PCR-RFLP sont très utiles pour le génotypage de souches de *Cryptosporidium* puisqu'elles peuvent identifier des sources d'infection humaine et procurer des données sur leur épidémiologie et leur survenue (23, 149). L'implication de souches spécifiques ou de types dans une épidémie peut ainsi être définie et le circuit épidémiologique de l'isolat au sein d'un pays ou entre des pays peut être compris.

Il existe de nombreux autres exemples pour lesquels les techniques de RFLP/PCR-RFLP sont utiles pour la discrimination entre des génotypes ; par exemple, le champignon *Candida* (39), le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (166) et la bactérie *Helicobacter pylori* (60).

Le pathogène humain *Candida krusei* donne une bonne illustration de l'application générale d'un ensemble de techniques moléculaires. Dassanayake *et al.* (39) ont étudié la diversité génique de 11 isolats oraux de *C. krusei* et ont identifié 5 génotypes différents en gel d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), 9 génotypes par RFLP en utilisant l'enzyme *HinfI*, alors que les empreintes d'ADN par l'approche de l'ADN polymorphique amplifié au hasard (RAPD-PCR pour *Randomly Amplified Polymorphic DNA*-PCR) a révélé 3, 8 ou 11 génotypes en fonction des amorces utilisées.

L'incorporation de PFGE facilite la séparation de grands fragments d'ADN (jusqu'à une taille de l'ordre de la megabase) et peut être un bon complément à l'analyse par RFLP de base. Jager *et al.* (72) ont utilisé une combinaison de l'enzyme de restriction à coupe rare *NotI* et la PFGE pour caractériser les 80 isolats de *Coxiella burnetii* obtenus sur des animaux et des humains en Europe, aux USA, en Afrique et en Asie. Ils ont distingué 20 profils de restriction différents et l'analyse phylogénétique des profils de RFLP a révélé l'évolution des relations entre les groupes qui correspondent à des origines géographiques différentes des isolats. Aucune corrélation entre le groupe de restriction et la virulence d'un isolat n'a été détectée dans cette étude, mais des approches similaires sur quelques autres agents pathogènes ont permis d'établir un lien. Grigg et Boothroyd (59), par exemple, ont identifié 3 sites de restriction au sein du locus B1 répété 35 fois, qui sont capables de faire une distinction entre des espèces de *Toxoplasma gondii* du type I (virulent chez la souris) et du type II ou III (non virulent chez la souris).

Les RFLPs sont importantes pour les études épidémiologiques, mais une interprétation plus critique des données de RFLP implique la construction de bases de données pour déterminer si les profils de RFLP sont liés à des facteurs tels que la virulence, la répartition de l'hôte et l'importance clinique. En pratique, il est d'usage de ne pas se fier à un seul site de restriction, mais d'utiliser des sites localisés à plusieurs endroits au sein du génome afin de classer l'isolat. Une question permanente pour les praticiens vétérinaires concerne l'estimation correcte de toutes différences moléculaires trouvées entre des isolats d'un agent pathogène sachant qu'une perte ou une acquisition de site(s) d'endonucléase de restriction peut ne pas être associée à des différences dans la capacité de l'agent pathogène à induire une maladie, par exemple, une différence en RFLP peut ne pas être significative fonctionnellement, excepté comme une caractéristique distinctive.

Les marqueurs polymorphiques utilisés dans la RAPD qui caractérisent des souches uniques, etc. peuvent être séquencés puis utilisés comme région amplifiée pour confirmation (SCAR pour *Sequence-confirmed amplified region*). Ainsi la transformation de marqueurs polymorphiques anonymes en SCAR signifie qu'une seule PCR peut être réalisée pour identifier un génome spécifique. Lewin *et al.* (81) ont utilisé cette approche pour identifier 19 génotypes à multilocus unique parmi les 29 souches du protozoaire *Leishmania donovani*.

Les techniques avec lesquelles l'ADN d'un agent pathogène peut être détecté et caractérisé continuent de s'améliorer et d'évoluer. La dernière procédure de discrimination en date est celle du séquençage d'un génome. Le séquençage d'une partie bien définie du génome joue un rôle important dans la caractérisation des agents pathogènes et dans les études épidémiologiques. Le séquençage des produits amplifiés par une PCR utilisant des amorces dégénérées ayant pour cible un gène commun à plusieurs virus de la même famille est devenu un outil de diagnostic très utilisé, notamment pour l'identification de membres d'une famille jusqu'alors non reconnus. Le séquençage d'amplicons du gène de l'ADN-polymérase des herpèsvirus obtenus par PCR dégénérée en est un bon exemple (173). Dans quelques cas, le génome viral complet a été séquencé. Par exemple, l'épidémie du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) et le séquençage du génome de 29 751 bases des coronavirus associés (92) a révélé utilement que le virus n'est lié que modérément aux coronavirus connus, y compris 2 coronavirus humains et ne ressemble pas même étroitement aux 3 groupes précédemment connus de coronavirus. Ce degré d'interrogation au niveau de l'acide nucléique ne sera pas disponible pour des études sur la majorité des agents pathogènes avant plusieurs années. C'est pourquoi des techniques comme les analyses par RFLP, PCR-RFLP, RAPD-PCR et SCAR vont continuer de jouer un rôle central dans l'identification de, et la discrimination entre, isolats de la plupart des agents pathogènes.

3. Diagnostic à l'aide de sondes nucléiques et de la technique des micropuces à ADN

Les recherches avec des sondes nucléiques ADN conventionnelles et les analyses par micropuces sont les deux côtés d'une même pièce. Le mécanisme fondamental des deux méthodes est la liaison (hybridation) de l'ADN, issu d'un échantillon suspecté de contenir un agent pathogène (l'« inconnu »), avec de l'ADN hautement caractérisé dérivé au préalable d'un agent pathogène intéressant (l'ADN « connu »).

Lors des recherches avec des sondes nucléiques ADN conventionnelles, l'ADN (ou l'ARN) inconnu, qui est la cible, est immobilisé sur une surface solide telle qu'un filtre. L'ADN connu, transformé en sonde après marquage ou identification (tag) d'une manière ou d'une autre, est dans la phase liquide et est appliqué sur la cible. Dans le diagnostic par micropuces, c'est l'ADN connu (ADN complémentaire ou oligonucléotides longs) qui est la cible, immobilisé sur une lame de verre, et l'ADN inconnu, dans la phase liquide, qui est marqué pour en faire une sonde.

Dans les recherches conventionnelles avec des sondes nucléiques ADN, la cible peut être des acides nucléiques extraits de matériel clinique ou de cultures cellulaires et soit (a) ajoutés à des filtres (dot ou slot blot) ou (b), transféré sur un filtre après gel d'électrophorèse, ce qui est moins pratique dans le contexte du diagnostic. La quantité d'agent pathogène dans un échantillon clinique peut être trop faible pour une détection. Par conséquent, il peut être nécessaire d'amplifier les acides nucléiques par une PCR ou par transcription reverse suivie d'une PCR (RT-PCR), le produit de PCR sera appliqué sur un filtre. Afin de visualiser une sonde liée à sa cible, la sonde peut être marquée avec un nucléotide radioactif ou, plus communément et plus inoffensif, identifiée de façon non-radioactive. Par exemple, la biotine ou la biotine-psoralène peuvent être incorporées dans la sonde, la sonde liée étant détectée par addition de streptavidine liée à une enzyme pour générer une réaction colorée ou lumineuse (chimiluminescence).

Une micropuce est ainsi appelée parce qu'elle peut comprendre 20 000 ou plus d'ADNs connus différents, chaque ADN étant déposé en point sur une lame de verre, pour former la puce. Chaque point ne mesure qu'environ 10 µm de diamètre. Les ADN complémentaires de fragments de gènes sélectionnés d'agents pathogènes peuvent être utilisés pour composer des puces (24). Cependant, si un grand nombre d'agents pathogènes doit être recherché, il sera alors plus aisé d'un point de vue pratique d'utiliser de grands oligonucléotides. La micropuce utilisée pour identifier le virus du SRAS comme étant un coronavirus avait des oligonucléotides comprenant 70 nucléotides (70-mer) (178). Dans les recherches utilisant des micropuces, c'est à partir de l'échantillon que la sonde est faite. En bref, l'acide nucléique est extrait de l'échantillon et une (RT-) PCR est effectuée en utilisant des amorces au hasard d'oligonucléotides. De cette façon, une partie de tous les acides nucléiques de l'échantillon – des deux origines : hôte et agent pathogène – sont amplifiés. Ces produits de PCR, représentatifs de tous les acides nucléiques de l'échantillon, sont marqués avec un colorant fluorescent et appliqués sur la micropuce. Dans des conditions optimisées, seul l'ADN dérivé de l'agent pathogène se liera à l'ADN sur la lame de verre. Si l'on est intéressé seulement par la détection d'un agent pathogène particulier ou d'un groupe d'agents pathogènes liés alors les oligonucléotides spécifiques peuvent être utilisés pour les amplifier au sein de l'échantillon pour la production de sonde.

Les micropuces pour la détection d'agents pathogènes peuvent être élaborées pour plusieurs niveaux de différenciation. Dans le cas de cibles d'oligonucléotides d'ADN, il faut tout d'abord définir les oligonucléotides capables de détecter et de différencier les agents pathogènes au niveau du genre. Il faudra choisir un nombre, peut-être 10, d'oligonucléotides avec un haut degré de conservation de séquence (oligonucléotides consensus) au sein d'un genre donné, de telle sorte qu'une sonde préparée à partir d'un échantillon de terrain contenant un membre de ce genre hybridera à coup sûr au moins quelques oligonucléotides, tandis qu'elle n'hybridera pas (ou à un moindre degré) celles correspondant aux genres apparentés. Par exemple, on pourra différencier les isolats d'*Aphthovirus* (fièvre aphteuse, FA) des espèces d'*Enterovirus* dans la famille des *Picornaviridae*. On pourra alors sélectionner d'autres jeux d'oligonucléotides, placés sur la même lame de verre, capables de caractériser plus spécifiquement un agent pathogène, par exemple pour différencier les 7 types de virus de FA, et éventuellement pour aller au niveau du sous-type.

Dans les études conventionnelles avec des acides nucléiques, la détection d'un agent pathogène est limitée par le nombre de sondes utilisées, alors que dans l'analyse avec micropuces seul le nombre d'ADN cible est limitant. Si une micropuce contient 1 000 oligonucléotides différents, il faudra 1 000 sondes (et 1 000 réactions séparées) pour obtenir le même niveau de résolution par analyse conventionnelle. Le grand avantage des analyses à micropuces dans la recherche d'un agent pathogène est que des centaines d'agents pathogènes peuvent être étudiés simultanément lors de l'utilisation d'une seule micropuce. Clairement, l'analyse par micropuce a un grand potentiel lorsque l'on recherche une maladie d'étiologie inconnue, des maladies où plusieurs agents pathogènes peuvent être présents, et lorsqu'un sous-typage est nécessaire. Pour augmenter la sensibilité dans l'identification des agents pathogènes, les micropuces peuvent être couplées à des amplifications par PCR. Ces PCR sont mises au point afin d'amplifier un ou plusieurs gènes conservés ou des séquences multiples, telles que des PCR utilisant des amorces largement conservées, des PCR « consensuelles » ou des PCR multiplex comme décrites

ci-dessus. Quand on soupçonne un agent pathogène en particulier, l'utilisation d'une micropuce est alors moins justifiée, car la production et l'hybridation des lames sont relativement coûteuses. Dans ces cas plus simples, il est préférable d'utiliser à la place des micropuces, des PCR spécifiques d'un agent pathogène ou du sous-type, suivies, pour confirmation, d'un séquençage ou d'une analyse des fragments de restriction.

S'il est permis de prédire l'avenir sur la base de l'expérience déjà acquise dans l'utilisation des biotechnologies, on peut espérer que le matériel et les réactifs deviendront moins coûteux, conduisant à une meilleure application de ces technologies dans le diagnostic des maladies animales. Cela facilitera la recherche de virus non identifiés jusqu'à présent, la caractérisation de souches bactériennes en terme de virulence, des marqueurs de sensibilité anti-microbienne ou d'autres marqueurs importants. L'un des défis à relever lors de l'utilisation d'une approche basée sur les micropuces est la gestion et l'analyse de la grande quantité de données qui sont générées.

4. Extraction des acides nucléiques

Les différentes épreuves de diagnostic moléculaires décrites dans cette section dépendent considérablement de la qualité des préparations d'acides nucléiques qui servent de matrices dans les réactions. Alors qu'il est relativement aisé d'extraire l'ADN de cultures bactériennes ou de sang, il est techniquement plus difficile de préparer du matériel acceptable à partir d'échantillons de fèces ou de produits issus d'avortements. Cette étape est déterminante car si le matériel qui va servir de cible n'a pas été purifié des contaminants présents dans l'échantillon clinique, les étapes ultérieures de l'épreuve seront compromises et pourraient donner de faux résultats (voir le Chapitre 1.1.5.). Il existe un certain nombre de techniques spécifiques pour des types particuliers d'échantillon ou de tissu, dont certaines sont disponibles dans le commerce soit manuelles soit automatisées pour stations de travail robotisées. Celles-ci sont destinées à améliorer la fiabilité de l'extraction des acides nucléiques à partir d'échantillons divers, mais l'extraction reste un domaine plein de défis.

B. DÉTECTION DE PROTÉINES

1. Immunohistochimie

L'immunohistochimie est rapidement devenue un outil de référence pour l'identification d'antigènes associés à des micro-organismes viraux, bactériens, protozoaires ou à l'encéphalopathie spongiforme bovine (128). La détection d'antigènes dans les tissus fixés présente plusieurs avantages par rapport aux autres techniques diagnostiques. Ces avantages sont : (a) facilité de soumission des échantillons ; (b) manipulation d'agents pathogènes humains sans risque ; (c) études rétrospectives à partir d'échantillons stockés ; (d) rapidité de la technique ; et (e) détection d'organismes inactivés (61). L'immunohistochimie est aussi utilisée pour la détection de protéine prion anormale (PrP^{Sc}) dans le tissu cérébral pour confirmer la tremblante, l'encéphalopathie spongiforme bovine et d'autres encéphalopathies spongiformes transmissibles. Elle s'est révélée plus sensible que l'examen histopathologique qui est la méthode de référence pour le diagnostic de ces maladies (160). La mise en évidence de PrP^{Sc} dans les biopsies de tissus lymphoïdes, par exemple la membrane nictitante, peut aussi être utilisée pour le diagnostic pré-clinique de la tremblante (107). Comme le nombre d'anticorps monoclonaux (AcMs) reconnaissant des antigènes d'organismes pathogènes augmente, l'utilisation de l'immunohistochimie pour l'identification d'organismes et d'autres marqueurs spécifiques de l'auto-immunité et des processus néoplasiques se développent de plus en plus. L'étape limitante pour cette technologie est la sélection d'un couple AcM/antigène réagissant malgré l'inclusion et la fixation au formol. Cette difficulté peut être contournée par l'utilisation de coupes congelées ou de techniques permettant de démasquer les antigènes (par exemple : la digestion enzymatique protéolytique, l'utilisation de micro-ondes) avant l'immunomarquage.

2. Immunotransfert

L'immunotransfert associe la haute résolution des gels d'électrophorèse avec la spécificité de la détection immuno-chimique et permet d'identifier des épitopes immunodominants reconnus par les anticorps d'animaux infectés ou par des AcMs dirigés contre l'agent pathogène cible. La procédure d'immunotransfert peut être divisée en 6 étapes :

- a) Préparation de l'échantillon ;
- b) Séparation de l'antigène par gel d'électrophorèse ;
- c) Transfert des polypeptides séparés sur une membrane de support (membrane de nitrocellulose) ;
- d) Blocage des sites de liaison non-spécifiques sur la membrane ;

- e) Incubation en présence d'e l'anticorps de détection ;
- f) Détection de l'anticorps de liaison.

Le choix de l'anticorps de détection est critique. Les sérums polyclonaux sont composés d'une gamme d'anticorps reflétant l'ensemble du répertoire de la réponse immune à un antigène complexe particulier. Ils vont de ce fait détecter un nombre de polypeptides distincts donnant un profil caractéristique de réactivité. Les AcMs se lient seulement à un épitope, c'est pourquoi ils sont utiles pour l'identification de polypeptides hautement spécifiques. Après l'incubation avec l'anticorps de détection, tous les anticorps liés aux bandes spécifiques de protéines sont visualisés par un anticorps anti-espèce dirigé contre le sérum et conjugué à une enzyme, puis révélé par un substrat-chromogène adapté.

L'immunotransfert est réalisé essentiellement dans des laboratoires de diagnostic pour identifier et/ou caractériser les agents infectieux par rapport à la spécificité antigénique ou pour suivre une réponse sérologique spécifique en utilisant des antigènes connus. Les faux-positifs et les faux-négatifs obtenus dans d'autres tests de diagnostic peuvent être souvent résolus par la technique d'immunotransfert (95). Un bon exemple de la détection d'antigènes est l'emploi de l'immunotransfert comme méthode essentielle dans le dépistage systématique de l'ESB ou de la tremblante ; il a été utilisé sur des millions d'échantillons de cerveau en Europe ou ailleurs pour la mise en évidence de la protéine prion (142). Des techniques d'immunotransfert modifiée (par ex : SAF-Western blot) sont utilisées comme tests de confirmation (14) et pour faire la différence entre ESB et tremblante (150). L'immunotransfert est également souvent utilisé pour déterminer la spécificité d'AcMs individuels. Des polypeptides individuels purifiés (ou des protéines recombinés) peuvent aussi être transférés sur des membranes de nitrocellulose par immunotransfert pour examiner la réactivité des sérums tests vis-à-vis des protéines individuelles. Ce profil caractéristique de réactivité peut être utilisé pour aider à distinguer des animaux qui ont été vaccinés de ceux qui ont été infectés en utilisant par exemple, le transfert électro-immuno-enzymatique (EITB pour *enzyme-linked immunoelectrotransfer blot*), un western blot pour la fièvre aphteuse qui est amplement utilisé en Amérique du Sud (16). Le facteur majeur pouvant affecter la réussite d'une technique d'immunotransfert est la nature des épitopes reconnus par les anticorps. La plupart des techniques de haute séparation sur gel impliquent une certaine dénaturation de l'antigène. Cela détruit les déterminants conformationnels et ne permet que la détection d'épitopes linéaires non-conformationnels. La majorité des anti-sérums polyclonaux contiennent des anticorps dirigés à la fois contre des épitopes linéaires et conformationnels, mais un AcM est dirigé contre un seul épitope ; ainsi, si sa cible est un épitope conformationnel, il ne réagira pas avec une protéine dénaturée.

Pour détecter des agents pathogènes dans des échantillons de tissu, contenant de grande quantité de protéine, une concentration sélective d'antigène et des méthodes sensibles de détection sont nécessaires. Un bon exemple de ces techniques a été fourni par la détection de la protéine prion (PrP^{Sc}) de la tremblante (97). Après élimination de protéine prion normale par une digestion avec une protéinase, la PrP^{Sc} est concentrée par précipitation avec du phosphotungstate de sodium ou avec de l'alcool, et le complexe antigène-anticorps sur le filtre ou la plaque ELISA est détecté en utilisant un substrat chimio-luminescent et un appareil photographique CCD ou un film à rayons X pour éliminer l'émission du bruit de fond (19, 137).

3. Méthode immuno-enzymatique avec capture d'antigène (ELISA)

La méthode immuno-enzymatique avec capture d'antigène (ELISA) permet la détection d'antigènes de l'agent pathogène impliqué avant ou pendant la phase clinique. L'ELISA se déroule en général selon une technique sandwich utilisant des anticorps de capture et des anticorps de détection (soit des AcMs spécifiques ou des anticorps polyclonaux). L'antigène présent dans l'échantillon est préalablement capturé par l'AcM spécifique ou l'anticorps polyclonal fixé sur une phase solide ; la fixation est révélée à l'aide d'un 2^e anticorps (monoclonal ou polyclonal) marqué radioactivement ou, plus généralement, à l'aide d'une enzyme (conjugué). Si l'anticorps de détection n'est pas conjugué alors un conjugué anti-espèce (réactif vis-à-vis de l'anticorps de détection) est utilisé. L'anticorps de capture sélectionne l'antigène-cible parmi les protéines en compétition dans les suspensions d'échantillon, et il faut s'assurer qu'il soit en semi-concentration pour augmenter les chances de sa détection. L'anticorps impliqué dans la capture doit présenter une forte affinité vis-à-vis de l'antigène de l'agent pathogène recherché, une reconnaissance hautement spécifique d'un épitope conservé de l'agent ciblé et doit pouvoir se fixer à une plaque ELISA sans perte d'activité. De plus, le 2^e AcM impliqué dans la révélation de la capture doit reconnaître un épitope différent de celui reconnu par l'anticorps impliqué dans la capture. Cependant, il peut être difficile d'identifier des AcMs ayant une réactivité intra-typique complète et des anti-sérums polyclonaux peuvent être préférés pour augmenter la probabilité de la réaction contre tous les variants antigéniques. Des applications de l'ELISA-capture ont été développées pour la détection d'*Anaplasma marginale* dans le sang de bovin au stade pré-clinique (164), de virus de la diarrhée virale bovine dans des échantillons de sang (94, 140), d'antigènes du virus de la peste bovine et de la peste des petits ruminants dans des prélèvements d'animaux cliniquement atteints (85). Un antigène du virus respiratoire syncytial est mis en évidence par ELISA-capture dans les sécrétions nasales avec des AcMs dirigés contre des épitopes de la capsid virale (108). Plusieurs ELISA de capture pour la détection de la protéine prion ont été validés et sont utilisés pour un dépistage rapide dans le monde entier (48, 50, 97). Des ELISA de capture sont aussi utilisés comme tests pour la cachexie chronique chez le cerf (60) et pour la tremblante chez les moutons et les chèvres

(49). Une méthode de capture d'antigène apparentée, le Priostrip test, qui est une méthode utilisant des bandelettes réactives, est aussi utilisée comme test de dépistage rapide pour l'ESB (50). Des méthodes liées à la capture d'antigènes et utilisant des billes magnétiques sont maintenant bien acceptées pour la détection de certaines infections bactériennes, incluant les *Listeria*, *Salmonella* et *Escherichia coli*. Le principe de cette technologie repose sur la séparation immunomagnétique, c'est-à-dire l'utilisation de petites particules para-magnétiques ou de billes recouvertes d'anticorps dirigés contre les antigènes de surface des micro-organismes. Autant les bactéries intactes que leurs déterminants antigéniques solubles peuvent être détectés après extraction magnétique de l'échantillon à tester, grâce à un second anticorps dans un système sandwich. Du fait de la liaison sur une surface solide, le test de capture d'antigène utilisant des billes immunomagnétiques peut accélérer la réaction antigène-anticorps. Le résultat est une réduction tant du temps de liaison non spécifique que de l'incubation.

La validation des épreuves pour détecter l'anticorps est décrite dans le Chapitre 1.1.4. « Principes de la validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses ».

4. Immunochromatographie

L'immunochromatographie représente une méthode pratique pour la détection des antigènes en quelques minutes sans équipement particulier (3, 90). L'échantillon est placé à une extrémité du filtre et des micro-billes (comme de l'or colloïdal) conjuguées à un anticorps sont appliquées. L'anticorps se combine avec le complexe microbilles-antigène puis il est fixé par le deuxième anticorps qui est sur le filtre ; il est alors facilement visualisé à l'endroit où le deuxième anticorps a été fixé.

5. Protéomique

Le protéome est l'ensemble total des protéines exprimées par une cellule, un tissu ou un organisme, et la protéomique est l'étude à grande échelle de ces protéines, incluant leur niveau d'expression, la modification post-translacionnelle et l'interaction avec les autres protéines. Puisque toutes les protéines ne sont pas exprimées en continu, mais sont dépendantes de facteurs physiologiques et environnementaux, la protéomique peut fournir une excellente vue d'ensemble d'un processus pathologique au niveau des protéines. Dans la mesure où les applications de la protéomique pour le développement de médicaments promettent de grandes retombées économiques, les industries de part le monde ont investi financièrement dans ce nouveau secteur de recherche (29).

De nombreuses méthodes utilisées en protéomique, en incluant les gels d'électrophorèse à deux dimensions (2DGE) et la spectrométrie de masse (SM), ont été établies depuis plusieurs années. Cependant les avancées récentes en techniques de SM, associées avec le séquençage du génome entier et le développement de plateformes puissantes en bio-informatique et robotique, ont révolutionnées l'identification des protéines. Le principe général de la protéomique repose sur la séparation des protéines, habituellement par 2DGE sur gels de polyacrylamide, puis les bandes correspondant aux protéines sont excisées, digérées avec de la trypsine, et les peptides résultant sont analysés par SM. Les masses de ces peptides sont ensuite comparées avec les masses de peptides prévues par les analyses informatiques de banques de données du génome, entraînant l'identification de gènes. La SM peut également être utilisée pour déduire la séquence en amino-acides de peptides et pour caractériser les modifications post-translacionnelles telles que la glycosylation ou la phosphorylation. La 2DGE présente quelques reculs, particulièrement pour la séparation de protéines hydrophobes, et d'autres techniques de séparation basées sur la chromatographie liquide trouvent maintenant quelques applications. Néanmoins, la 2DGE est une méthode de choix pour créer des cartes quantitatives d'expression de protéines et plusieurs milliers de protéines peuvent être analysées dans un temps limité.

Les altérations du protéome des tissus d'un organisme ou de ces liquides tels que le sérum, l'urine ou le liquide cérébro-spinal peuvent être mesurées directement de telle sorte que les changements qui surviennent lors d'un état pathologique peuvent être identifiés précisément. Cette approche constitue un outil très puissant pour le diagnostic précoce des maladies, ainsi que dans l'identification de molécules qui pourraient être les cibles de nouvelles thérapies. Les applications cliniques les plus établies de la protéomique sont jusqu'à maintenant l'identification de marqueurs de diagnostic précoce de cancers, tels que les cancers de la vessie dans l'urine (131). Cependant, des efforts considérables de recherche sont également menés dans d'autres secteurs comme les maladies cardiaques (74), la maladie d'Alzheimer (34) et les diabètes insulino-dépendants (1).

L'utilisation de la protéomique pour le diagnostic de maladies infectieuses en est encore à ces débuts, mais elle a montré qu'elle est d'une importance considérable. Par exemple, le diagnostic définitif de l'infection à virus B de l'hépatite chronique repose encore sur une biopsie de foie, mais l'analyse protéomique d'échantillons de sérum montre que l'expression d'au moins 7 protéines sériques est modifiée significativement chez les patients souffrant d'hépatite B chronique (63). De même, le diagnostic différentiel *ante mortem* de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD) peut être facilité par la protéomique puisque des données préliminaires montrent que 7 protéines du fluide

cérébro-spinal sont exprimées différemment par les patients atteints de CJD sporadique ou par ceux atteints du variant (35).

Une application extrêmement utile de la protéomique pour le diagnostic des maladies infectieuses est l'identification de nouveaux antigènes de diagnostic par le criblage de sérums d'individus infectés et non-infectés contre des immunoblots de 2DGE de protéomes cartographiés d'agents infectieux. En utilisant ce type d'approche avec des sérums humains, 9 nouveaux antigènes d'immunodiagnostic potentiels ont été identifiés chez *Helicobacter pylori* (56), plus de 80 antigènes de *Borrelia burgdorferi* qui peuvent potentiellement différencier des patients avec des symptômes précoces ou tardifs de la maladie de Lyme (74) et 7 antigènes de *Toxoplasma gondii* qui peuvent différencier potentiellement des toxoplasmoses aiguës ou latentes (74).

Au sein du secteur vétérinaire, des projets de recherche basés sur la protéomique sont maintenant en cours et vont sans aucun doute conduire à de nouveaux outils de diagnostic pour le futur. Des cartes de protéomes sont en cours de réalisation pour de nombreux agents pathogènes vétérinaires incluant des bactéries telles *Brucella melitensis* (98) et *Streptococcus agalactiae* (71), des protozoaires tels que *Toxoplasma gondii* (36), *Eimeria tenella* (28) et *Trypanosoma brucei* (134) et des nématodes tels que *Haemonchus contortus* (186).

C. DÉTECTION DES ANTICORPS

1. ELISA de compétition (c-ELISA)

L'ELISA de compétition (c-ELISA) est une épreuve qui permet la détection ou la quantification d'anticorps ou d'antigènes par une méthode de compétition. Le c-ELISA pour la mise en évidence d'anticorps spécifiques a largement remplacé l'ELISA indirect pour les enquêtes à grande échelle et la sérosurveillance. Le c-ELISA offre des avantages significatifs par rapport à la méthode indirecte puisque des échantillons de nombreuses espèces peuvent être testés sans qu'il soit nécessaire d'avoir des conjugués spécifiques d'espèces couplés à des enzymes pour chaque espèce à tester. De nombreux antigènes sont extrêmement difficiles à purifier ou demande beaucoup de temps. S'ils sont utilisés dans une épreuve indirecte, ils donneront des valeurs de bruit de fond élevées dues aux liaisons non spécifiques. Cependant, des antigènes relativement bruts peuvent être utilisés en c-ELISA, si l'anticorps de détection présente la spécificité souhaitée. Le principe de l'épreuve de compétition pour la détection des anticorps repose sur la compétition entre le sérum à tester et le sérum de détection. La liaison spécifique de l'anticorps de détection est mise en évidence en utilisant un conjugué anti-espèce approprié. Une diminution de la couleur attendue obtenue est due à la liaison des anticorps dans le sérum à tester, qui empêche la liaison de l'anticorps de détection.

L'anticorps de détection peut être polyclonal ou monoclonal en fonction de la spécificité nécessaire. Les AcMs dirigés contre des épitopes hautement conservés donneront des épreuves à réactivité large alors que ceux dirigés contre les épitopes hautement spécifiques donneront une épreuve très spécifique. L'un des premiers rapports sur l'utilisation du c-ELISA concernait son utilisation dans la détection des anticorps anti-fièvre catarrhale du mouton (4). Celui-ci utilise un AcM dirigé contre un épitope hautement conservé du virus de la fièvre catarrhale (BTV pour *Bluetongue Virus*) P7 et permet la détection des anticorps des 24 sérotypes de BTV. L'épitope n'était partagé par aucun autre séro-groupe d'Orbivirus étroitement lié, c'est pourquoi l'épreuve était également spécifique de BTV. La spécificité de l'épreuve peut de ce fait être adaptée en fonction de la spécificité de l'anticorps de détection. La sensibilité du c-ELISA est améliorée en utilisant des anticorps de détection directement conjugués à une enzyme (83).

Le principe du c-ELISA a été utilisé avec succès dans les enquêtes de dépistage concernant de grands nombres de sérum de porc pour les anticorps de la peste porcine classique (181), la détection de l'anticorps du virus de la fièvre catarrhale chez les moutons infectés inapparents, les cerfs et les bisons (83, 84) et les anticorps vis-à-vis de *Babesia equi* et *B. caballi* chez les chevaux infectés permanents (77, 78). Un ELISA de compétition pour la brucellose, basé sur le lipopolysaccharide immunodominant de *Brucella* en phase lisse, a été largement utilisé comme test de criblage chez les bovins (104), les moutons et chèvres (102), les porcs (103) et les mammifères marins (105). Plus récemment, un c-ELISA à phase solide a été utilisé pour une surveillance sérologique à grande échelle lors de l'épidémie de 2001 de fièvre aphteuse au Royaume-Uni (111). Cela a facilité l'analyse de quelques 3 millions de sérum sur une période de moins d'un an.

2. Production d'antigènes par la technologie de l'ADN recombiné

Les progrès en biologie moléculaire et en génétique dans les années 1970 ont initié le développement de la technologie de l'ADN recombiné. Depuis, l'impact de cette technologie est telle qu'elle joue un rôle vital aussi bien en recherche scientifique qu'en diagnostic et en traitement de maladies. La technologie de l'ADN recombiné repose simplement sur le transfert d'un gène d'un organisme vers un autre – littéralement, la recombinaison d'ADN de sources différentes. Les objectifs de la technologie de l'ADN recombiné incluent l'identification de gènes, l'isolement de gènes, la modification de gènes, et la ré-expression de gènes dans d'autres hôtes ou

organismes. Ces étapes permettent aux scientifiques et aux cliniciens d'identifier de nouveaux gènes et les protéines qu'ils codent, pour corriger des défaillances génétiques endogènes, et pour produire de grandes quantités des produits d'un gène spécifique tels que des hormones, des antigènes pour des vaccins, et d'autres protéines produites par des agents biologiques intéressants. Le degré de spécificité des épreuves de diagnostic réalisables par utilisation de protéines recombinées est d'une importance particulière. Un exemple est l'utilisation de ESAT-6/CFO-10, (antigènes immunogéniques sécrétés) présent chez *Mycobacterium bovis* virulent et *M. tuberculosis*, mais absent chez le BCG avirulent et la plupart des mycobactéries de l'environnement, pour le diagnostic de la tuberculose chez les bovins et les humains (31, 165). Les peptides (ESAT-6 et CFP-10) des antigènes de *M. tuberculosis* ont amélioré la spécificité quand ils étaient utilisés dans une épreuve ELISPOT pour la détection de l'interféron gamma pour diagnostiquer une infection à *M. tuberculosis* (67). Cette technique est potentiellement capable de procurer un degré de spécificité du diagnostic qui ne peut pas être atteint avec les dérivés de protéines purifiées (PPD, *Purified Protein Derivative*) comme l'extrait bactérien couramment utilisé.

Les protéines natives sont probablement les antigènes parfaits, qui fournissent des séquences spécifiques et des épitopes structuraux de surface. De nombreuses épreuves de diagnostic actuelles nécessitent des antigènes devant être produits en continu à partir de cultures cellulaires ou obtenus sur des animaux infectés. Ces préparations antigéniques sont coûteuses et ont souvent une demi-vie courte, et pour chaque nouveau lot d'antigènes une normalisation est nécessaire. Les protéines naturelles sont rarement disponibles sous forme complètement pure, et les anticorps se développent souvent contre des polypeptides contaminants. Ce qui conduit à des résultats faux-positifs. La technologie de l'ADN recombiné produit des antigènes qui offrent de nombreux avantages par rapport aux antigènes isolés à partir de sources biologiques. Ces avantages comprennent un taux de pureté élevé, une haute activité spécifique. Par ailleurs, comme la protéine est synthétisée dans des cellules cultivées en laboratoire et génétiquement modifiées, chaque préparation de protéine produite est identique à la préparation précédente, ce qui assure la constance des lots. Lorsque des antigènes recombinés sont utilisés en combinaison avec un C-ELISA, la purification de l'antigène recombiné à partir du lysat peut ne pas être nécessaire puisque la spécificité du C-ELISA repose principalement sur l'AcM utilisé. Un exemple de la procédure est le clonage des gènes d'enveloppe des lentivirus de l'arthrite/encéphalite caprine dans un vecteur d'expression du virus de la vaccine (86). Des peptides synthétiques peuvent aussi être utilisés efficacement comme antigènes pour le diagnostic au laboratoire vétérinaire. Le diagnostic par des épreuves basées sur les peptides repose sur la sélection de petits fragments qui portent les épitopes immunologiques les plus puissants (linéaires) et qui sont reconnus par les anticorps spécifiques induits par l'ensemble des protéines virales. Au cours des dernières années, des peptides synthétiques imitant les épitopes spécifiques de protéines d'agents infectieux ont été utilisés dans des systèmes de diagnostic pour plusieurs maladies humaines ou animales. Les protéines recombinées et les peptides synthétiques sont très utiles pour les tests d'accompagnement DIVA car ils permettent de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés. Les vaccins marqués possèdent au minimum une protéine antigénique en moins par rapport au virus sauvage correspondant, ce qui permet de tracer des souches sauvages circulant chez des animaux vaccinés (65).

Un aperçu de la procédure de production d'un antigène par la technologie de l'ADN recombiné est décrit ci-dessous. L'identification d'un antigène ayant un potentiel diagnostic ou un intérêt scientifique est réalisée par l'étude de la réponse en anticorps de l'hôte vis-à-vis des protéines de l'organisme en question. Les antigènes immunodominants (protéines définies d'un organisme contre lequel l'hôte répond avec le titre le plus élevé) sont d'un intérêt particulier puisqu'ils sont des stimulants majeurs de l'immunité cellulaire et humorale contre la maladie en question. Les études sur de nouveaux antigènes sont très utilisées pour identifier des antigènes immunodominants, biologiquement significatifs, pour une utilisation dans le développement d'AcMs ou de vaccins. Lorsqu'une protéine intéressante a été identifiée, le gène codant cette protéine est obtenu en utilisant l'ARN messager (ARNm) d'un organisme comme empreinte pour l'ADNc. Cette méthode de clonage du gène codant une protéine d'intérêt nécessite au préalable une connaissance de la séquence du gène, soit directement de l'organisme en question ou par l'utilisation des séquences d'un gène d'une espèce étroitement liée. Lorsque la séquence d'un gène n'est pas disponible, une méthode alternative, est la préparation de banques d'ADN recombiné issues de l'ADN génomique de l'organisme ou de l'ADNc synthétisé à partir de l'ARNm. Des fragments des banques d'ADN recombiné peuvent être clonés dans un système d'expression, qui peut être procaryotique ou eucaryotique. La banque de gènes est alors criblée pour l'expression de la protéine.

Il y existe un grand choix de systèmes d'expression. Les protéines peuvent être exprimées par des bactéries, habituellement *E. coli* (125), par des levures (33), par des cellules d'insecte en utilisant le baculovirus (151), ou encore par des cellules eucaryotes en les infectant avec le vecteur viral approprié (147) ou par transfection permanente. Les différences de glycosylation selon que l'on utilise des bactéries, des cultures de cellules d'insectes ou de mammifères peuvent modifier la structure des protéines et leur réactivité avec les anticorps. Il peut s'avérer utile d'extraire l'antigène des cellules ou de le faire sécréter par la cellule. La purification est souvent, mais pas toujours, nécessaire. Une nouvelle tendance dans la production d'antigènes pour une utilisation dans les épreuves est le développement d'antigènes peptidiques synthétiques. Ceci permet de tester les antigènes comme réactifs de diagnostic à partir d'une séquence de gène, sans que l'expression de la protéine entière soit nécessaire, ce qui réduit la procédure. Un exemple est la production d'antigènes peptidiques de deux antigènes immunodominants, décrits comme des candidats prometteurs pour les réactifs de diagnostic de détection de l'infection des bovins avec *M. bovis* (176). Récemment, l'utilisation de plantes comme système d'expression de protéines semble prometteuse. Dans le cas d'expression d'antigènes candidats par des plantes,

les virus végétaux présentent, entre autres, les avantages de la rapidité de mise au point du produit, de la flexibilité et de niveaux élevés d'expression des gènes (54).

Les séquences génomiques de centaines de bactéries et de milliers de virus ont déjà été établies. Un gène codant un antigène peut aisément être cloné par PCR en utilisant les amorces ciblant les séquences nucléotidiques d'espèces étroitement apparentées (130). Le gène peut aussi être exprimé et son produit peut être purifié par l'emploi d'un peptide marqueur. L'antigénicité du produit codé par le gène peut être évaluée. Le criblage systématique de gènes codant des antigènes *in silico*, à partir des banques de séquences des génomes accélère la mise au point de kits pour le diagnostic et de vaccins (163).

D. VACCINS

1. Vaccins avec délétion de gènes - bactéries

Au cours des dix dernières années, la technologie de l'ADN recombiné a permis de mettre au point des vaccins vivants plus sûrs. Comparés aux vaccins à bactéries tuées, les vaccins à base de bactéries vivantes atténuées confèrent une meilleure protection contre une infection (70). Les raisons de cette meilleure protection ne sont pas clairement connues aujourd'hui, mais l'une des raisons pourrait être la capacité qu'ont les vaccins vivants d'exprimer *in vivo* les antigènes nécessaires à la protection alors que ceux-ci ne sont pas présents dans les vaccins tués. Une autre raison pourrait être la capacité des vaccins vivants de stimuler les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) ce que ne peuvent pas faire les préparations à vaccins tués. Plus probablement, il s'agit d'une combinaison des deux, nouvelle expression d'antigènes et interaction avec les CPA. Le développement de vaccins avec des bactéries vivantes atténuées repose principalement sur l'obtention et la sélection de mutants par passages en série sur d'autres animaux hôtes, par cultures *in vitro* prolongées, par des changements de température de croissance ou des modifications chimiques, qui résultent en des atténuations non définies, ayant pour base une accumulation de multiples mutations génétiques. Dans certains cas, pour des raisons inconnues, ces mutants reviennent au phénotype sauvage et de ce fait ne peuvent pas être utilisés comme vaccins (148). En 1981, Hosieth & Stocker (68), avec la technologie utilisant les transposons, ont développé des souches de *Salmonella typhimurium* avec des mutations génétiques auxotrophiques définies pour les acides aminés aromatiques (Aro) et qui sont incapables de survivre chez l'hôte immunocompétent. Ces souches ont été capables d'induire une protection lors d'un test d'épreuve virulent dans le modèle murin de salmonellose et dans plusieurs espèces domestiques, bien que pour des raisons inconnues, tous les mutants n'ont pas été capables de conférer une protection dans les espèces domestiques (145). En 1992, Jones *et al.* (73) ont développé un mutant de *salmonella* atténué vivant en utilisant une excision génomique précise de 2 gènes impliqués dans la voie des acides aminés aromatiques, qui a résulté en une probabilité encore plus faible de retour vers le phénotype sauvage. Il a été démontré que ce mutant avait des effets secondaires cliniques relativement légers et était capable de conférer une protection chez les bovins lors d'un test d'épreuve effectué à l'âge où l'hôte est le plus sensible. Cette souche vaccinale a également été utilisée comme vecteur pour délivrer des antigènes, la rapprochant plus ainsi de la dose multivaccinale unique qui est considérée actuellement comme la méthode idéale de vaccination (174). Les développements de la biologie moléculaire et une meilleure compréhension de l'interaction hôte-pathogène permettront l'ébauche rationnelle de vaccins plus inoffensifs et plus efficaces avec des marqueurs de distinction entre les animaux vaccinés et les animaux infectés. Bien que la plupart des développements décrits dans ce chapitre concernent *Salmonella*, des technologies similaires sont appliquées à d'autres bactéries pathogènes. Cette technologie a été utilisée dans le cas de la tuberculose bovine ; si des bovins sont vaccinés avec le BCG, le cocktail de peptides ESAT-6/CFO-10 détecte dans une épreuve de recherche de l'interféron-gamma, les animaux infectés non vaccinés.

2. Vaccins marqueurs et épreuves de diagnostic associées

En santé animale, on peut soit vacciner les animaux afin de prévenir une maladie soit essayer d'éliminer une infection par application stricte de mesures sanitaires telles que l'abattage des animaux infectés et ceux ayant été en contact avec l'agent pathogène. Pour certaines maladies pour lesquelles il n'existe pas de vaccin (par exemple la peste porcine africaine) et en particulier pour les infections zoonotiques (par exemple : l'infection des porcs par le virus Nipah), l'abattage systématique des animaux infectés est l'unique solution disponible. Le diagnostic de l'infection est d'importance primordiale quelles que soient les mesures prises pour lutter contre la maladie. Le diagnostic peut être direct, par la détection de l'agent infectieux avec des technologies d'immunologie ou moléculaire, ou indirect, basé sur la détection et l'identification des anticorps spécifiques contre l'agent infectieux suspecté. Ces dernières méthodes ont un inconvénient majeur puisqu'il faut attendre que les anticorps soient synthétisés par l'animal après l'infection et ils ne permettent pas généralement la distinction entre une réponse immune humorale résultant d'une infection ou de celle faisant suite à la vaccination.

Ce problème peut être résolu en adoptant de nouvelles approches pour le développement de vaccins (109) en utilisant des technologies moléculaires, qui permettent la production de marqueurs vaccinaux auxquels sont associés des épreuves de diagnostic. Il existe actuellement deux types : ceux basés sur la détection de la

réponse sérologique contre une protéine dont le gène a été délété de l'espèce vaccinante (soit utilisé comme vaccin à réplication ou soit comme vaccin inactivé dérivé d'une telle souche virale vaccinale délétée), et ceux basés sur la détection de la réponse sérologique vis-à-vis des protéines virales non impliquées dans la structure (vaccins inactivés purifiés). Dans le cas de vaccins délétés, le gène codant une protéine non essentielle, le marqueur caractéristique, est toujours lié avec l'épreuve de détection alors que dans le cas de sous-unités vaccinales (par exemple : protéine E2 du virus de la peste porcine classique exprimée dans le baculovirus) le choix du marqueur de l'épreuve peut être lié à plusieurs autres protéines virales. Pour des raisons d'harmonisation, une protéine donnée doit être choisie pour les épreuves (par exemple : la protéine gE du virus de la maladie d'Aujeszky). Dans le 1^{er} type de vaccins marqueurs, le marqueur doit toujours être négatif puisqu'un marqueur positif, obtenu par exemple avec l'insertion d'un gène codant une protéine étrangère, n'est pas approprié ; un tel vaccin montrera si l'animal a été vacciné mais il n'indiquera pas si l'animal était aussi infecté avec le virus sauvage. Le vaccin marqueur utilisé avec l'intention de distinguer une réponse sérologique résultant soit de la vaccination soit de l'infection doit toujours être associé à une épreuve de diagnostic spécifique du marqueur, qui peut être utilisée pendant une campagne de prophylaxie afin d'éliminer l'agent infectieux. A l'origine les vaccins vétérinaires étaient destinés à prévenir les signes cliniques chez les animaux sans vraiment tenir compte de l'impact épidémiologique de la vaccination sur l'excrétion de virus sauvage après infection et sur sa dissémination / circulation. Si les marqueurs vaccinaux sont utilisés dans le but d'éliminer un virus, ils doivent avoir un impact net sur l'épidémiologie de l'infection.

Il peut y avoir des problèmes avec cette approche, par exemple si la multiplication de virus sauvage est inhibée au point qu'il n'y a pas induction d'anticorps spécifiques chez tous les animaux vaccinés. C'est pourquoi, la plupart des vaccins marqueurs ne peuvent être utilisés que pour la certification des élevages et pas pour la certification des animaux individuellement.

a) Vaccins marqueurs avec délétion d'un gène : les exemples du virus de la maladie d'Aujeszky et de la rhinotrachéite infectieuse bovine

La maladie d'Aujeszky chez les porcs et la rhinotrachéite infectieuse bovine sont deux infections dues à des herpesvirus qui deviennent latents chez l'animal, même s'il a déjà été vacciné (115, 119, 120). Le premier vaccin marqueur a été disponible en prévention de l'infection par le virus de la maladie d'Aujeszky chez les porcs (169) suite au développement d'une souche atténuée par Bartha en Hongrie (13). Cette souche présente une délétion spontanée dans la glycoprotéine gE. Des vaccins analogues ont été développés plus tard pour la rhinotrachéite infectieuse bovine.

Comme mentionné ci-dessus, l'herpesvirus responsable de la rhinotrachéite infectieuse bovine devient latent après l'infection, que l'animal ait été vacciné ou non. Il importe peu que le vaccin soit inactivé ou atténué, l'animal devient un porteur latent après l'infection avec le virus sauvage. De plus, toutes les souches de vaccins atténués induisent une latence après l'infection, y compris les souches délétées de gE. Il doit être clair que tous les vaccins atténués produits avec des souches identiques, délétées ou non, sont généralement plus efficaces que leurs équivalents inactivés (25, 75, 76).

Dans une région où la vaccination est interdite, tous les animaux sérologiquement positifs au regard du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine doivent être considérés comme potentiellement infectés et porteurs sains pour un virus sauvage. De manière similaire, dans la région où les animaux sont vaccinés avec un vaccin conventionnel (non délété), soit atténué, soit inactivé, il est impossible de distinguer un bovin infecté d'un vacciné et de ce fait, si un programme d'élimination est mis en place, tous les animaux séropositifs doivent être également éliminés de l'élevage.

Une solution peut venir de l'utilisation de vaccins marqueurs/délétés permettant de différencier entre les anticorps induits par vaccination de ceux consécutifs à une infection. Les protéines délétées dans la souche vaccinale doivent avoir les caractéristiques suivantes :

- 1) Être une protéine de structure, de façon à produire des vaccins inactivés ;
- 2) Ne pas être essentielle à la production du vaccin ;
- 3) Ne pas être un immunogène protecteur essentiel de façon à conserver un vaccin efficace ;
- 4) Induire une réponse immunitaire humorale significative et à suffisamment long terme lorsqu'elle existe afin d'être utilisée (lorsqu'elle est délétée) comme un marqueur ;
- 5) Être présente dans toutes les souches virales sauvages ;
- 6) Induire une réponse immunitaire humorale ou cellulaire chez les animaux déjà vaccinés lorsque ceux-ci sont infectés par le virus sauvage.

Si un tel vaccin marqueur est utilisé, un animal séropositif vis-à-vis d'une protéine délétée, doit être considéré comme infecté et éliminé. La protéine gD de l'herpesvirus, un immunogène protecteur majeur, ne peut pas être délétée, mais au contraire doit être utilisée pour développer des sous-unités vaccinales. Le principal problème rencontré lors de l'utilisation de vaccins marqueurs contre la rhinotrachéite infectieuse bovine est leur inhabilité à prévenir totalement la circulation des virus sauvages lorsqu'ils sont utilisés dans le cadre d'un programme d'éradication.

Aucun vaccin disponible n'est capable d'induire une immunité stérile contre ces maladies. En conséquence, le programme de vaccination doit être plus strict qu'un programme conventionnel destiné seulement à protéger contre les signes cliniques dans l'élevage. La vaccination doit être répétée en fonction d'un programme strict pour réduire la possibilité d'excrétion de virus sauvage et doit, en plus, être associée avec des mesures sanitaires strictes (85). Au sein du programme d'une campagne coordonnée d'éradication de virus, la vaccination doit empêcher l'excrétion de virus sauvage par des animaux n'ayant jamais été en contact avec le virus et prévenir la ré-excrétion par des animaux infectés de manière latente.

L'efficacité d'une vaccination répétée utilisant un vaccin inactivé négatif pour gE, administré par voie intramusculaire a été étudiée dans les conditions du terrain au Pays-Bas. Cette étude a montré une incidence significativement réduite de la séroconversion contre le virus sauvage dans le groupe vacciné comparé aux animaux contrôles inoculés avec un placebo. De plus, la circulation de virus sauvage, lorsqu'elle n'est pas complètement contrôlée, était néanmoins significativement diminuée (25) et même empêchée dans certaines circonstances (170).

b) Vaccination contre la peste porcine classique avec des sous-unités vaccinales

Un programme d'éradication de la peste porcine classique a été établi dans l'Union Européenne. La vaccination utilisant des vaccins conventionnels est maintenant interdite et une mesure d'abattage est en place. Cette mesure est mise à l'épreuve par l'existence d'une forte relation antigénique avec d'autres pestivirus, tel que le virus responsable de la diarrhée virale bovine, qui gêne le diagnostic sérologique, la circulation insidieuse de souches hypovirulentes (21) et, la dernière contrainte mais non des moindres, la présence d'un réservoir sauvage chez le sanglier (*Sus scrofa*) en Europe continentale (11).

Les vaccins classiques, conventionnels, ont une efficacité bien prouvée (127) et ils ont même empêché l'émergence de porteurs asymptomatiques lorsqu'ils étaient suffisamment efficaces (22, 80). À ce niveau, les vaccins vivants atténués étaient plus efficaces que leurs homologues inactivés (38) et ils ont grandement contribué à l'élimination de la maladie. Leur seul inconvénient était la création de population d'animaux sérologiquement positifs, ce qui n'est pas acceptable lorsqu'une mesure d'abattage est mise en place. Les sous-unités de vaccins ont été développées récemment par l'expression de la protéine E2, un immunogène majeur du virus de la peste porcine classique, soit en système à baculovirus (van Rijn, 1999 129 /id}) ou par les virus de la vaccine ou de la maladie d'Aujeszky (E1) (136, 172). Le baculovirus exprimant la protéine vaccinale E2 permet la distinction entre les animaux infectés ou les animaux vaccinés lorsqu'il est utilisé avec des épreuves de diagnostic spécifiques de ce marqueur et fiables pour détecter la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre d'autres immunogènes majeurs du virus de la peste porcine classique non présents dans la sous-unité vaccinale, telle que la protéine NS2, une protéine conservée du virus. Malheureusement, les vaccins inactivés ne sont pas suffisamment efficaces d'un point de vue épidémiologique (44) comparés aux vaccins conventionnels antérieurs (42, 167). De plus, les épreuves de diagnostic associées, actuellement disponibles, ne sont pas totalement fiables et limitent, de ce fait, l'utilisation de ces sous-unités vaccinales sur le terrain.

c) Vaccination contre la fièvre aphteuse par utilisation de vaccins hautement purifiés

La vaccination préventive a été interdite dans l'Union Européenne depuis 1991. Cette interdiction a mis fin à une période de 30 années de vaccination et en conséquence, des bovins n'ayant jamais été en contact avec le virus sont maintenant élevés en Europe (153). Cette situation est particulièrement préjudiciable lorsque la maladie est accidentellement ré-introduite (45). Le plan d'urgence qui a été développé pour gérer les épizooties inattendues est principalement basé sur l'information et la formation des partenaires concernés dans l'Union Européenne. Afin de maîtriser les risques associés à la totale sensibilité des élevages Européens, des banques d'antigènes viraux vaccinaux concentrés et hautement purifiés ont été établies (139) et il est possible de les utiliser comme marqueurs vaccinaux en cas d'urgence d'épizootie (41).

Cela est possible puisque, lorsque des vaccins hautement purifiés sont utilisés, si un animal est séropositif en test ELISA pour les protéines non-structurales (NSP pour *Non Structural Protein*) codées par le virus (40), cela signifie qu'il doit avoir été infecté par un virus sauvage. Les NSP sont produites lors de la réplication du virus chez un animal infecté ou en culture cellulaire. Les NSP doivent être éliminées de l'antigène du virus de la fièvre aphteuse par purification au cours de la production du vaccin et des tests appropriés doivent être conduits pour démontrer l'absence d'anticorps anti-NSP chez les animaux vaccinés. Les NSP sont synthétisées au même taux que les protéines structurales pendant l'infection et induisent donc une bonne réponse immunitaire humorale. Les animaux infectés développent des anticorps anti-NSP

qui sont détectés habituellement par des kits de diagnostic ELISA ou EITB. Malheureusement, les épreuves de diagnostic associées qui sont actuellement disponibles ne permettent que la certification d'élevages exempts de fièvre aphteuse et pas la certification au niveau de l'animal individuel. Les NSP sont seulement produites lors de la multiplication du virus et ne sont pas présents dans les virions extracellulaires utilisés pour produire les vaccins purifiés inactivés.

d) Cas particulier de la grippe équine

Une approche similaire à celle utilisée pour la fièvre aphteuse a été mise en place, dans un contexte différent, pour la grippe équine (114). Lorsque des études ont été effectuées sur la durée de l'immunité protectrice avec les vaccins inactivés contre la grippe équine, il est utile d'avoir un outil de diagnostic qui permette l'exclusion d'anticorps dus à une infection croisée des animaux expérimentaux avec un virus sauvage de la grippe. Une épreuve de diagnostic a été développée (20), basée sur la réponse sérologique vis-à-vis d'une protéine non-structurale codée par le virus.

3. Vaccins à virus vectorisés

De nombreuses espèces de virus, y compris les adénovirus, les herpèsvirus et les poxvirus, ont été utilisées comme système de délivrance (vecteurs) pour des antigènes étrangers. Le virus peut être utilisé simplement comme un vecteur, par exemple le virus recombiné rage-virus de la vaccine, ou à la fois comme un vecteur et un vaccin contre l'infection par le vecteur sauvage lui-même. Un exemple de virus agissant à la fois comme un vecteur et un vaccin est le virus capripox recombiné exprimant un antigène du virus de la peste des petits ruminants (17). Un virus vecteur peut effectuer un cycle de multiplication complet conduisant à la production de virus fils ou de cycle de multiplication avorté sans production de virus fils, comme c'est le cas du vecteur poxvirus aviaire pour les espèces de mammifères.

Les vecteurs le plus communément utilisés sont les poxvirus aviaires et ce chapitre va de ce fait s'orienter sur l'utilisation de poxvirus comme vecteurs de vaccins (121).

Un certain nombre de caractéristiques font que les poxvirus aviaires recombinés sont convenables comme vaccins :

- i) La stabilité des vaccins lyophilisés (35), leur faible coût, la facilité de production et d'administration ;
- ii) Le vaccin peut être administré par plusieurs voies (52) et dans le cas du virus de la vaccine il a même été montré que le virus peut être administré *per os* (cette caractéristique a été utilisée pour la vaccination de la faune sauvage) (117) ;
- iii) La capacité à induire à la fois une réponse humorale et cellulaire T contre les antigènes étrangers avec une immunité à long terme après une simple inoculation (146, 147) ;
- iv) La flexibilité de conditionnement du génome, qui permet de perdre ou de déléter une grande partie du génome et d'insérer de l'ADN étranger à la place (au moins 25 kb), ce qui permet de créer des vaccins multivalents (122, 123, 146, 147) ;
- v) L'utilisation de poxvirus aviaires recombinés comme vaccins permet la discrimination entre des animaux naturellement infectés et des animaux vaccinés puisque le vaccin recombiné présente un ensemble défini d'antigènes des agents pathogènes concernés.

Au sein de chaque genre de la famille des *Poxviridae*, les membres sont antigéniquement liés (96). Cette relation antigénique a soulevé une question importante concernant l'utilisation de vecteurs dérivés de poxvirus aviaires comme vaccins vivants, car une immunité pré-existante contre le vecteur peut réduire le succès d'une vaccination ultérieure réalisée avec un vecteur poxvirus homologue (37, 79). Pour contourner ce problème, l'utilisation de combinaisons différentes de vecteurs et/ou de voies d'immunisation ont été mises en place (51, 129).

a) Virus de la vaccine comme vecteur

Le premier virus recombiné de la vaccine à avoir été utilisé sur le terrain est le vaccin recombiné virus de la vaccine-rage (VRG) utilisé pour la vaccination orale de renards contre la rage. Ce vaccin a été développé en utilisant la souche Copenhagen et a été testé dans de nombreuses espèces cibles potentielles dans des conditions de laboratoire (27, 116, 159) avant d'être finalement utilisé ensuite dans les conditions de terrain en 1987 (118) et avoir démontré être inoffensif et efficace (27). Il a été utilisé à grande échelle dans de nombreux pays d'Europe qui ont été, en conséquence, libérés de la rage (26) ainsi qu'en Amérique du Nord.

L'innocuité du virus de la vaccine peut être améliorée par des délétions multiples de gènes. Cela a été démontré par des manipulations de la souche NYVAC de virus de la vaccine (156). La souche Copenhagen du virus de la vaccine a été choisie comme support vaccinal. Sur la base de la séquence entière de l'ADN (55), de la connaissance importante des gènes liés à la virulence et de la détermination des gènes

compétents pour la réplication chez l'hôte, il est possible d'éliminer du génome viral de manière très précise, les informations génétiques non désirées. Le virus résultant, nommé NYVAC, possède 18 cadres ouverts de lecture délétés par rapport à la souche mère. NYVAC est hautement atténué comme cela a été démontré dans de nombreuses espèces animales. L'inoculation intra-cérébrale chez des souris nouveau-nées et des jeunes adultes a mis en évidence une échelle de doses très favorable par rapport aux souches parentales ou d'autres souches du virus de la vaccine. Plus significativement, il n'y a pas de dissémination du virus chez des hôtes immunodéprimés. NYVAC a une capacité de réplication considérablement réduite dans une grande variété de cultures cellulaires de tissus humains, et est incapable de produire des particules infectieuses chez l'homme. Plusieurs essais chez les animaux et l'homme ont démontré l'innocuité des vecteurs dérivés de la souche NYVAC (112, 155, 180).

b) Vecteurs à poxvirus aviaires

Lorsque l'on considère le développement de vecteurs dérivés de poxvirus aviaires pour la production de vaccins destinés aux oiseaux, l'utilisation de souches atténuées est recommandée afin de réduire le risque sanitaire et les conséquences potentielles dues à une diffusion dans l'environnement à d'autres espèces aviaires. Des dérivés atténués de virus de la variole aviaire, comme TROVAC, et le virus de la variole du canari, comme ALVAC, ont été testés extensivement et leur innocuité a été démontrée dans une variété d'espèces, incluant des animaux immunodéprimés et des volontaires humains. Ces virus peuvent être utilisés dans des conditions de laboratoires ayant un niveau de confinement 1, la catégorie la plus basse pour des organismes recombinés (113).

Malgré le fait que leur multiplication est restreinte aux espèces aviaires, il a été démontré que les souches atténuées de poxvirus aviaires étaient des vecteurs efficaces et extrêmement inoffensifs pour les mammifères. L'inoculation de recombinés à base de poxvirus aviaires dans des cellules de mammifères entraîne une expression des gènes étrangers et une inoculation à des mammifères induit une immunité protectrice sans production de virus fils (157, 158). Cette observation démontre qu'ils ont un avantage sanitaire significatif pour une utilisation chez l'homme et les animaux. Puisqu'une immunisation peut être réalisée en absence de réplication productive, cela élimine l'éventualité d'une dissémination du vecteur aux seins des individus vaccinés et, de ce fait, la diffusion du vecteur à des hôtes non-vaccinés ou dans l'environnement général. De plus, l'utilisation de ce vecteur dans une espèce qui n'est pas un réservoir des poxvirus aviaires rend la probabilité de recombinaison nulle *in vivo*. Enfin, ces vecteurs peuvent être utilisés pour la vaccination d'individus présentant déjà une immunité au virus de la vaccine.

Dans les dix dernières années, un grand nombre de virus recombinés ont été produits en utilisant la souche ALVAC atténuée du virus de la variole du canari comme souche parentale. Un nombre impressionnant d'essais, à la fois chez l'homme et les animaux, a démontré l'innocuité et l'efficacité de protection des vaccins utilisant ce vecteur.

4. Vaccins à base d'ADN

La vaccination à ADN consiste à introduire directement dans la cellule hôte un plasmide bactérien à ADN qui exprime une protéine antigénique placée sous le contrôle d'un promoteur cellulaire eucaryote (133). En conséquence, l'antigène étranger est exprimé au sein de la cellule hôte et peut stimuler l'induction de réponses immunitaires humorale et à médiation cellulaire. Cette approche de la vaccination a été efficace contre un grand nombre de virus, de bactéries et de parasites et n'a pas seulement les avantages nombreux de vaccins vivants mais aussi beaucoup plus d'avantages que les approches conventionnelles de la vaccination. Par exemple, les vaccins à ADN codant des gènes étrangers sont peu coûteux et faciles à produire ; ils parent à la nécessité d'organismes porteurs complexes ; les risques associés aux vaccins vivants sont absents ; et l'impact de l'immunité pré-existante vis-à-vis de l'organisme ou du vecteur sur l'efficacité du vaccin est contourné. Cependant, un désavantage de la vaccination à ADN est que, dans la mesure où le plasmide persiste pendant longtemps, il existe un risque potentiel d'intégration chromosomique résultant en une transformation cellulaire.

La réponse immunitaire des vaccins à ADN peut être améliorée par une inoculation simultanée d'immunostimulants tels que des séquences à motifs CpG (126), des plasmides exprimant des cytokines (185), des plasmides exprimant des molécules de co-stimulation (91), ou même des adjuvants conventionnels (171). L'immunogénicité peut également être améliorée par le premier amorçage (« priming ») avec un vaccin à ADN plasmidique exprimant une protéine immunogène suivi d'une re-stimulation avec la protéine ou le vecteur viral recombiné exprimant la protéine, la fameuse approche « amorçage-re-stimulation » (« prime-boost ») (175).

Plusieurs vaccins à ADN à usage vétérinaire sont actuellement développés chez les bovins, les porcs et les volailles (106, 110, 171). Ainsi un nouveau vaccin pour les chevaux, le West-Nile-Innovator® DNA, permet de prévenir la virémie du virus West-Nile, qui est potentiellement mortel; cela représente une étape extraordinaire dans la technologie basée sur l'ADN. L'apport de l'ADN est effectué soit par inoculation intra-musculaire, intradermique ou intra-nasale, par l'introduction intradermique médiée par des particules utilisant un revolver à gènes, dans lequel l'ADN est adsorbé sur des microsphères d'or (88), ou il peut être apporté en utilisant des

bactéries intra-cellulaires atténuées telles que *Shigella flexneri* ou *Salmonella typhimurium*. Les vaccins à bactéries vivantes atténuées permettent de vacciner à travers les muqueuses et ainsi de cibler spécifiquement les cellules présentatrices des antigènes dans les sites inducteurs du système immunologique. Alors que cette dernière approche présente plusieurs avantages, il existe un certain nombre de critères sanitaires qui doivent être abordés avant que cette méthode d'inoculation soit acceptée. Les inconvénients de la vaccination par ADN doivent être gardés présents à l'esprit, comme par exemple, bien que le risque soit faible, la possibilité d'une ré-intégration dans les chromosomes ce qui conduirait à une transformation cellulaire puisque le plasmide persiste chez l'hôte pendant longtemps.

Une autre stratégie de vaccins à ADN est basée sur un vecteur à ADN consistant en de l'ADNc recombiné du virus de la forêt de Semliki (SFV) placé sous le contrôle d'un promoteur eucaryote et exprimant un gène étranger (15). Contrairement aux vecteurs à ADN conventionnels, le promoteur ne dirige pas directement l'expression de l'antigène étranger, mais dirige la synthèse du transcrit d'ARN, réplicon de SFV recombiné. La traduction de cette molécule d'ARN produit un complexe de réplicase de SFV, qui permet la réplication de l'ARN dans le cytoplasme cellulaire et induit un haut niveau de production de l'ARNm pour cet antigène étranger codé. Dans la mesure où l'expression induite par le vecteur SFV est transitoire et lytique, il existe moins de risque d'une intégration possible dans les chromosomes.

La mise en œuvre de la technologie du chromosome bactérien artificiel (BAC pour *bacterial artificial chromosome*) a ouvert de nouvelles voies pour la manipulation des grands génomes à ADN de virus, tels que les herpesvirus (2, 30). L'utilisation de clones BAC d'herpesvirus n'est pas seulement un outil précieux pour l'étude des fonctions des gènes viraux et de la pathogénie (177), mais présente un fort potentiel pour le développement de vaccins anti-herpesvirus (100). Des expériences utilisant des clones BAC comme vaccins contre les infections à herpesvirus ont donné des résultats prometteurs (124, 154, 161). Cette technologie pour la mise au point de vaccins anti-herpesvirus novateurs aura un impact certain et de grandes applications en médecine vétérinaire.

5. Autres développements en technologie vaccinale

Des sous-unités vaccinales qui contiennent des protéines purifiées ou des composés glycoprotéiques d'un agent pathogène et qui ont été identifiés comme porteurs d'épitopes critiques impliqués dans l'induction d'une réponse immunitaire protectrice (12), présentent un net avantage d'innocuité, et des améliorations récentes dans leur production utilisant la technologie à base d'ADN recombiné facilitera une plus large utilisation (43). Des vaccins à base de peptides synthétiques ont aussi été mis au point (93), cependant, jusqu'à présent, ils n'ont pas été très efficaces dans l'induction d'une protection contre les maladies infectieuses. Il existe de nombreuses raisons pour lesquelles des peptides synthétiques peuvent ne pas induire une immunité protectrice. Par exemple, même les peptides linéaires présentent un degré de flexibilité de conformation telle qu'ils adoptent une structure différente de la molécule-parent et de ce fait, ils induisent des anticorps de faible avidité pour l'agent pathogène en question. Un désavantage non négligeable de l'utilisation de peptides stimulant une réponse en anticorps protecteurs mais vis-à-vis d'un unique site antigénique, est la possibilité de favoriser une sélection de certaines mutations antigéniques chez l'agent pathogène.

Un certain nombre de stratégies a été développé pour induire des réponses des cellules T cytotoxiques (CTC) utilisant des peptides, tels que coupler des épitopes CTC à des toxines qui sont capables d'envahir des cellules eucaryotes ou construire des particules ressemblant à des particules virales portant des épitopes CTC étrangers (141, 144). Cependant, l'utilité de cette approche dans des populations sans lien de parenté est limitée par le polymorphisme des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. D'autres vaccins à base de particules ressemblant à des virus qui impliquent des protéines de structure peuvent être utilisés pour transporter des antigènes étrangers. De tels vaccins ont été faits à partir de particules produites par le gène *Tya* du rétrotransposon Ty de levure (53). Un vaccin composé de particules vides ressemblant à des virus et produites par l'expression des 4 protéines majeures de structures du virus de la fièvre catarrhale du mouton dans le baculovirus a montré qu'il protège contre une épreuve avec le virus de la fièvre catarrhale (135).

Une autre approche intéressante est le développement de « vaccins comestibles ». Des plantes peuvent être développées pour exprimer un certain nombre de protéines et peuvent exprimer de multiples transgènes en une seule fois (152). L'administration orale de sous-unités vaccinales exprimées dans des plantes pourrait être adaptée contre des agents pathogènes intestinaux. Un désavantage sera que des antigènes administrés par voie orale seront sensibles à la dégradation protéolytique. De plus, l'administration orale d'antigènes tend à induire une tolérance plutôt qu'une immunité active. Cependant, la tolérance peut être contournée par l'expression d'une protéine de fusion composée de l'antigène avec la sous-unité B de l'entérotoxine sensible à la chaleur (LT-B) de *E. coli* (62).

Le clonage d'un génome viral complet, en particulier pour les virus à ARN à sens négatif, a été rendu possible grâce à la génétique reverse. Par génétique reverse, la fonction de plusieurs NSP, ainsi que les fonctions cachées des protéines virales, ont pu être élucidées, permettant alors la construction de virus ARN par recombinaison. Cela permet aussi l'identification de la stratégie d'évitement utilisée par un virus afin d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte comme, par exemple, l'interféron (57, 168). La génétique reverse ouvre une nouvelle approche pour l'atténuation des virus en supprimant les fonctions anti-interféron ou anti-cytokines

du virus. La génétique réverse peut être appliquée aux virus à ARN qui ont une structure génomique relativement simple, comme le virus de la grippe aviaire. Il a été démontré que la présence de résidus basiques d'acides aminés au niveau du site de clivage du gène de l'hémagglutinine favorise la réplication du virus chez l'animal. Ainsi, les virus de l'influenza aviaire hautement pathogènes qui présentent ce type de structure génétique pourraient être atténués en éliminant les résidus basiques d'acides aminés du site (87, 101).

E. LES NANOTECHNOLOGIES DANS LE DOMAINE DU DIAGNOSTIC ET DU DÉVELOPPEMENT DES VACCINS

Les nanotechnologies permettent de travailler au niveau atomique, moléculaire et supramoléculaire à une échelle de 1 à 100 nanomètres, dans le but de comprendre, de créer et d'utiliser des matériaux, des dispositifs et des systèmes dotés de propriétés fondamentalement nouvelles du fait de la petite taille des structures impliquées. Les possibilités d'utilisation des nanotechnologies en médecine vétérinaire sont actuellement à l'étude (184).

1. Diagnostic

La nanotechnologie présente un intérêt majeur pour le diagnostic médical (7). Les nanoparticules font preuve d'une capacité extraordinaire de détecter les marqueurs de maladie, les cellules précancéreuses et les fragments de virus. De même, des revêtements métalliques et des nanoparticules métalliques fonctionnalisées à l'aide de différentes biomolécules permettent de détecter des protéines et des anticorps spécifiques. Par exemple, les chercheurs ont mis au point un nanofil de silicium, porteur d'une charge particulière et connecté à un récepteur d'anticorps capable de détecter la présence de marqueurs du cancer dans le sang, même si la concentration de ces antigènes dans le sang est de l'ordre d'un centième de milliardième du contenu protéique. Ces capteurs sont bien plus précis que n'importe quelle autre technologie actuellement disponible.

De même, toujours dans le domaine du diagnostic, des dispositifs qui ressemblent à une lame de microscope parsemée de minuscules pores à l'échelle nanoscopique permettent d'examiner les molécules d'ADN dans le sang pour rechercher des signes de maladie (8).

Des travaux récents (5) ont montré que les ultrasons détectent les nanoparticules de sorte que celles-ci sont ensuite capables d'« illuminer » l'image obtenue. Ces points lumineux peuvent signifier qu'un petit nombre de cellules de la zone examinée sont peut-être sur le point de muter ou d'évoluer de manière incontrôlée. Il est espéré que l'utilisation combinée des ultrasons et des nanotechnologies permettra de réaliser des diagnostics fiables sans recourir à des procédés invasifs comme les biopsies.

Nanoparticle Diagnostics travaille actuellement sur plusieurs projets de développement de tests diagnostiques rapides et portables pour les besoins de la médecine vétérinaire et humaine (9).

2. Développement de vaccins

La plupart des nanotechnologies appliquées au développement de vaccins ont pour but d'améliorer les systèmes de vaccination et l'efficacité des vaccins. L'une de ces applications est la nanoémulsion (6), c'est-à-dire une suspension de minuscules gouttelettes d'huile dans l'eau stabilisées par des détergents. Les gouttelettes de cette nanoémulsion sont actives en surface et réagissent spécifiquement en présence de la membrane externe d'un micro-organisme pathogène. Cette technologie n'opère pas de la même manière que les antibiotiques ou les antiseptiques traditionnels et ne présente aucun danger pour l'homme, l'animal ou l'environnement. Dans l'application vaccinale, on administre à l'animal, directement par le nez, une préparation comprenant une nanoémulsion et un virus entier ou une protéine. Ce procédé fait intervenir les composants de l'immunité nécessaires à la création d'un vaccin.

Les perspectives ouvertes par les vaccins basés sur une nanoémulsion sont extrêmement prometteuses car ces vaccins sont administrés sans seringues et ne requièrent pas de réfrigération, ce qui présente un grand intérêt dans les pays en développement.

Dans une application spécifique (18), une forte réponse immune a été déclenchée chez des animaux à qui l'on a administré par voie intranasale une nanoémulsion contenant une protéine recombinée de *Bacillus anthracis*. L'apparition de la réponse immune est intervenue chez ces animaux dès la deuxième application. Tous les animaux ainsi immunisés ont survécu à l'inoculation d'épreuve, alors que les animaux du groupe de contrôle ont tous succombé.

D'autres projets en cours (10) portent sur la mise au point de timbres transdermiques dont la face en contact avec la peau est parsemée de micro-protubérances en forme d'aiguilles qui contiennent le médicament à administrer. La face porteuse des micro-protubérances est appliquée directement sur la peau de sorte que les aiguilles

perforent la peau uniquement jusqu'à l'espace interstitiel, sans atteindre les nerfs ni les veines. Les composants nanostructurés diffusés dans l'espace interstitiel par les micro-protubérances sont absorbés par les cellules du système immunitaire en vue d'une application vaccinale. Ces timbres sont destinés à une utilisation en médecine humaine et vétérinaire, et serviront à administrer des vaccins, des protéines et des peptides, des hormones peptidiques et d'autres médicaments.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AANSTOOT H.J., KANG S.M., KIM J., LINDSAY L.A., ROLL U., KNIP M., ATKINSON M., MOSE-LARSEN P., FEY S., LUDVIGSSON J., ET AL. (1996). Identification and characterization of glima 38, a glycosylated islet cell membrane antigen, which together with gad65 and ia2 marks the early phases of autoimmune response in type 1 diabetes. *J. Clin. Invest.*, **97**, 2772–2783.
2. ADLER H., MESSERLE M. & KOSZINOWSKI U.H. (2003). Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev. Med. Virol.*, **13**, 111–121.
3. AL-YOUSIF Y., ANDERSON J., CHARD-BERGSTROM C. & KAPIL S. (2002). Development, evaluation, and application of lateral-flow immunoassay (immunochromatography) for detection of rotavirus in bovine fecal samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **9**, 723–725.
4. ANDERSON J. (1984). Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus. *J. Immunol. Methods*, **74**, 139–149.
5. ANON (2006). Nanotechnology can identify disease at early cellular level. www.rxpnews.com/research/biotechnology/nanotechnology/article_4162.shtml, accessed on 07 January 2008.
6. ANON (2006). U-M professor's nanotechnology company secures \$30 million investment. www.umich.edu/news/?Releases/2006/Aug06/r080706a, accessed on 09 January 2008.
7. ANON (2007). Nanotechnology for Medical Diagnosis. March 14, 2007. www.nanotechnologydevelopment.com/medical/nanotechnology-for-medical-diagnosis.html, accessed on 07 January 2008.
8. ANON (2007). New blood test leads to early disease diagnosis. March 8, 2007. www.nanotech-now.com/news.cgi?story_id=21053, accessed on 07 January 2008.
9. ANON (2007). The Nanotechnology Landscape in Victoria. www.wit.org.au/images/News%20Archives/0606%20BioNanoVic.pdf, accessed on 10 January 2008.
10. ANON (2007). Nanotechnology Victoria – BioPharmaceutical Delivery Projects. www.nanovic.com.au/?a=industry_focus.drugdelivery&p=186, accessed on 09 January 2008.
11. AUBERT M., PICARD M., FOUQUET E., CONDÉ J., CRUCIÈRE C., FERRY R., ALBINA E., BARRAT J. & VEDEAU F. (1994). La peste porcine classique du sanglier en europe. *Ann. Méd. Vét.*, **138**, 239–247.
12. BABIUK I.A. (1997). Subunit vaccines. In: Veterinary Vaccinology, Pastoret P.-P., Blancou J., Vannier P. & Verschueren C., eds. Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands, 262–264.
13. BARTHA A. (1961). Experiments to reduce the virulence of aujeszky's virus. *Magy. Allartov. Lapja.*, **16**, 42–45.
14. BEEKES M., BALDAUF E., CASENS S., DIRINGER H., KEYES P., SCOTT A.C., WELLS G.A.H., BROWN P., GIBBS C.J. JR & GAJDUSEK D.C. (1995). Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with transmissible spongiform encephalopathies using a high-yield purification method. *J. Gen. Virol.*, **76**, 2567–2576.
15. BERGLUND P., SMERDOU C., FLEETON M.N., TUBULEKAS I. & LILJESTROM P. (1998). Enhancing immune responses using suicidal DNA vaccines. *Nature Biotechnology*, **16**, 562–565.
16. BERGMANN I.E., DE MELLO P.A., NEITZERT E. & GOMEZ I. (1993). Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bio-engineered non-structural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 825–832.

17. BERHE G., MINET C., LE GOFF C., BARRETT T., NGANGNOU A., GRILLET C., LIBEAU G., FLEMING M., BLACK D.N. & DIALLO A. (2003). Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *J. Virol.*, **77**, 1571–1577.
18. BIELINSKA A.U., JANCZAK K.W., LANDERS J.J., MAKIDON P., SOWER L.E., PETERSON J.W. & BAKER J.R. (2007). Mucosal immunization with a novel nanoemulsion-based recombinant anthrax protective antigen vaccine protects against *Bacillus anthracis* spore challenge. *Infection and Immunity*, **75**, 4020–4029.
19. BIFFIGER K., ZWALD D., KAUFMANN L., BRINER A., NAYKI I., PURRO M., BOTTCHER S., STRUCKMEYER T., SCHALLER O., MEYER R., FATZER R., ZURBRIGGEN A., STACK M., MOSER M., OESCH B. & KUBLER E. (2002). Validation of a luminescence immunoassay for the detection of PrP^(Sc) in brain homogenate. *J. Virol. Methods*, **101**, 79–84.
20. BIRCH-MACHIN I., ROWAN A., PICK J., MUMFORD J.A. & BINNS M.M. (1997). Expression of the non structural protein NS1 of equine influenza A virus: detection of anti-NS1 antibody in post infection equine sera. *J. Virol. Methods*, **65**, 255–263.
21. BIRONT P., LEUNEN J., DEPIERREUX R., VANDEVELDE A., PASTORET P.P. & DEWAELE A. (1983). La peste porcine classique : diagnostic, transmission et prophylaxie. *Ann. Méd. Vét.*, **127**, 547–563.
22. BIRONT P., LEUNEN J. & VANDEPUTTE J. (1987). Inhibition of virus replication in the tonsils of pigs previously vaccinated with a Chinese strain vaccine and challenged oronasally with a virulent strain of classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, **14**, 105–113.
23. BONNIN A., FOURMAUX M.N., DUBREMETZ J.F., NELSON R.G., GOBET P., HARLY G., BUISSON M., PUYGAUTHIER-TOUBAS D., GABRIEL-POSPISIL G., NACIRI M. & CAMERLYNCK P. (1996). Genotyping human and bovine isolates of *Cryptosporidium parvum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a repetitive DNA sequence. *FEMS Microbiol. Lett.*, **137**, 207–211.
24. BOONHAM N., WALSH K., SMITH P., MADAGAN K., GRAHAM I & PARKER I. (2003). Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *J. Virol. Methods*, **108**, 181–187.
25. BOSCH J.C., KAASHOEK M.J., KROESE A.H. & VAN OIRSCHOT J.T. (1996). An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccines. *Vet. Microbiol.*, **52**, 223–234.
26. BROCHIER B., DECHAMPS P., COSTY F., HALLET L., LEURIS J., VILLERS M., PEHARPRE D., MOSSELMANS F., BEIER R., LECOMTE L., MULLIER P., ROLAND H., BAUDUIN B., KERVYN T., RENDERS C., ESCUTENNAIRE S. & PASTORET P.P. (2001). Elimination de la rage en Belgique par la vaccination du renard roux (*Vulpes vulpes*). *Ann. Méd. Vét.*, **145**, 293–305.
27. BROCHIER B., KIENY M.P., COSTY F., COPPENS P., BAUDUIN B., LECOCQ J.P., LANGUET B., CHAPPUIS G., DESMETTRE P., AFIADAMANYO K., LIBOIS R. & PASTORET P.P. (1991). Large-scale eradication of rabies with a recombinant vaccinia-rabies virus. *Nature*, **354**, 520–522.
28. BROMLEY E., LEEDS N., CLARK J., MCGREGOR E., WARD M., DUNN M.J. & TOMLEY F. (2003). Defining the protein repertoire of microneme secretory organelles in the apicomplexan parasite *Eimeria tenella*. *Proteomics*, **3**, 1553–1561.
29. BROWER V. (2001). Proteomics: biology in the post-genomic era. *EMBO Reports*, **2**, 558–560.
30. BRUNE W., MESSERLE M. & KOSZINOWSKI U.H. (2000). Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet.*, **16**, 254–259.
31. BUDDLE B.M., PARLANE N.A., KEEN D.L., ALDWELL F.E., POLLOCK J.M., LIGHTBODY K. & ANDERSEN P. (1999). Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clin Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 1–5.
32. BURKHARDT H.J. (2000). Standardisation and quality control of PCR analyses. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **38**, 87–91.
33. CARTER B.L.A., IRANI M. & MACKAY V.L. (1987). Expression and secretion of foreign genes in yeast. In: DNA Cloning, Volume iii. Glover D.M., ed. Oxford University Press, Oxford, UK, 141–162.
34. CHOE L.H., DUTT M.J., RELKIN N. & LEE K.H. (2002). Studies of potential cerebrospinal fluid molecular markers for Alzheimer's disease. *Electrophoresis*, **23**, 2257–2251.

35. CHOE L.H., GREEN A., KNIGHT R.S., THOMPSON E.J. & LEE K.H. (2002). Apolipoprotein E and other cerebrospinal fluid proteins differentiate ante mortem variant Creutzfeldt-Jakob disease from ante mortem sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Electrophoresis*, **23**, 2242–2246.
36. COHEN A.M., RUMPEL K., COOMBS G.H. & WASTLING J.M. (2002). Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, **32**, 39–51.
37. COONEY E.L., McELRATH M.J., COREY., HU S.L., COLLIER A.C., ARDITTI D., HOFFMAN M., COOMBS R.W., SMITH G.E. & GREENBERG P.D. (1993). Enhanced immunity to human immunodeficiency virus (HIV) envelope elicited by a combined vaccine regimen consisting of priming with a vaccinia recombinant expressing HIV envelope and boosting with gp 160 protein. *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **90**, 1882–1886.
38. CORTIER G., GALICHER C. & GELFI J. (1975). Peste porcine : étude comparée du pouvoir immunogène des vaccins à virus vivant et à virus inactivé par la cinétique des anticorps neutralisants dans le sérum. *Ann. Rech. Vét.*, **6**, 93–101.
39. DASSANAYAKE R.S. & SAMARANAYAKE L.P. (2003). Amplification-based nucleic acid scanning techniques to assess genetic polymorphism in *Candida*. *Crit. Rev. Microbiol.*, **29**, 1–24.
40. DE DIEGO M., BROCCHI E., MACKAY D. & DE SIMONE F. (1997). The non-structural polyprotein 3 ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch. Virol.*, **142**, 2021–2033.
41. DECLERCQ C. (2002). La vaccination comme outil de lutte contre la fièvre aphteuse. *Ann. Méd. Vét.*, **146**, 155–160.
42. DEPNER K.R., BOUMA A., KOENEN F., KLINKENBERG D., LANGE E., DE SMIT H. & VANDERHALLEN H. (2001). Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial ii. Challenge study in pregnant sows. *Vet. Microbiol.*, **83**, 107–120.
43. DESMETTRE P. (1999). Diagnosis and prevention of equine infectious diseases: present states, potential and challenges for the future. *Adv. Vet. Med.*, **41**, 359–377.
44. DEWULF J., LAESENS H., KOENEN F., MINTIENS K. & DE KRUIF A. (2001). An E2 sub-unit marker vaccine does not prevent horizontal or vertical transmission of classical swine fever virus. *Vaccine*, **20**, 86–91.
45. DONALDSON A.J. & DOEL T.R. (1994). La fièvre aphteuse : le risque pour la grande-bretagne après 1992. *Ann. Méd. Vét.*, **138**, 283–293.
46. EHLERS B., ULRICH S. & GOLTZ M. (1999). Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses. *J. Gen. Virol.*, **80**, 971–978.
47. ELNIFRO E.M., ASHSHI A.M., COOPER R.J. & KLAPPER P.E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**, 559–570.
48. EUROPEAN COMMISSION (2003). Opinion of the Scientific Steering Committee on the Field Trial Evaluation of Two New Rapid BSE Post Mortem Tests; results achieved using the LIA Test (Prionics) and the aCDI Test (*InPro*) in the field trial. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Steering Committee, Brussels Belgium. Available at: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out316_en.pdf
49. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2003). Scientific Report on the Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants. EFSA, Parma, Italy. Available at: http://www.efsa.eu.int/science/tse_assessments/bse_tse/1157_en.html
50. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2004). Scientific Report on the Evaluation of Seven New Rapid Post Mortem BSE Tests. EFSA, Parma, Italy. Available at: http://www.efsa.eu.int/science/tse_assessments/bse_tse/694_en.html
51. FLEXNER C., MURPHY B.R., ROONEY J.F., WOHLBERG C., YUFEROV V., NOTKINS A.L. & MOSS B. (1988). Successful vaccination with a polyvalent live vector despite existing immunity to an expressed antigen. *Nature*, **335**, 259–262.
52. GHERARDI M.M. & ESTEBAN M. (1999). Mucosal and systemic immune responses induced after oral delivery of vaccinia virus recombinants. *Vaccine*, **17**, 1074–1083.
53. GILBERT S.C. (2001). Virus-like particles as vaccine adjuvants. *Molecul. Biotechnol.*, **19**, 169–177.

54. GLEBA Y., KLIMYUK V. & MARILLONNET S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**:134-141.
55. GOEBEL S.J., JOHNSON G.P., PERKUS M.E., DAVIS S.W., WINSLOW J.P. & PAOLETTI E. (1990). The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology*, **179**, 247–266.
56. GOEBEL U.B., VOGT K., ROZNOWSKI A.B., WIEDENMANN B.J., MEYER T.F., AEIBISCHER T. & JUNGBLUT P.R. (2002). Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics*, **2**, 313–324.
57. GOODBOURN S., DIDCOCK L. & RANDALL R.E. (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.*, **81**, 2341–2364.
58. GREISEN K., LOEFFELHOLZ M., PUROHIT A., LEONG D. (1994). PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 335–351.
59. GRIGG M.E. & BOOTHROYD J.C. (2001). Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 398–400.
60. GZYL A., AUGUSTYNOWICZ E., DZIERZANOWSKA D., ROZYNEK E., DURA W., CELINSKA-CEDRO D. & BERG D.E. (1999). Genotypes of *Helicobacter pylori* in polish population. *Acta Microbiol. Pol.*, **48**, 261–275.
61. HAINES D.M. & CLARK E.G. (1991). Enzyme immunohistochemical staining of formalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. *Can. Vet. J.*, **32**, 295–302.
62. HAQ T.A., MASON H.S., CLEMENTS J.D. & ARNTZEN C.J. (1995). Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*, **268**, 714–716.
63. HE Q.Y., LAU G.K., ZHOU Y., YUEN S.T., LIN M.C., KUNG H.F. & CHIU J.F. (2003). Serum biomarkers of hepatitis B virus infected liver inflammation: A proteomic study. *Proteomics*, **3**, 666–674.
64. HEIM A., EBNET C., HARSTE G. & PRING-AKERBLOM P. (2003). Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J. Med. Virol.*, **70**, 228–239.
65. HENDERSON L.M. (2005). Overview of marker vaccine and differential diagnostic test technology. *Biologicals*, **33**, 203-209.
66. HIBLER C.P., WILSON K.L., SPRAKER T.R., MILLER M.W., ZINK R.R., DEBUSE L.L., ANDERSEN E., SCHWEITZER D., KENNEDY J.A., BAETEN L.A., SMELTZER J.F., SALMAN M.D. & POWERS B.E. (2003). Field validation and assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting chronic wasting disease in mule deer (*Odocoileus hemionus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), and Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*). *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 311–319.
67. HILL P.C., JACKSON-SILLAH D., FOX A., FRANKEN K. L., LUGOS M.D., JEFFRIES D.J., DONKOR S.A., HAMMOND A.S., ADEGBOLA R.A., OTTENHOFF T.H., KLEIN M.R. & BROOKES R.H. (2005). ESAT-6/CFP-10 fusion protein and peptides for optimal diagnosis of mycobacterium tuberculosis infection by ex vivo enzyme-linked immunospot assay in the Gambia. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2070-2074.
68. HOISETH S.K. & STOCKER B.A. (1981). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*, **291**, 238–239.
69. HORIMOTO T. & KAWAOKA Y. (1995). Direct reverse transcriptase PCR to determine virulence potential of influenza A virus in birds. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 748–751.
70. HORMAECHÉ C.E., KHAN C.M.A., MASTROENI P., VILLARREAL B., DOUGAN G., ROBERTS M. & CHATFIELD S.N. (1995). Salmonella vaccines: mechanisms of immunity and their use as carriers of recombinant antigens. In: Molecular and Clinical Aspects of Bacterial Vaccine Development, Ala'Aldeen D.A.A. & Hormaeche C.E., eds. John Wiley and Sons Ltd, Guildford, UK, 119–153.
71. HUGHES M.J., MOORE J.C., LANE J.D., WILSON R., PRIBUL P.K., YOUNES Z.N., DOBSON R.J., EVEREST P., REASON A.J., REDFERN J.M., GREER F.M., PAXTON T., PANICO M., MORRIS H.R., FELDMAN R.G. & SANTANGELO J.D. (2002). Identification of major outer surface proteins of *Streptococcus agalactiae*. *Infect. Immun.*, **70**, 1254–1259.
72. JAGER C., WILLEMS H., THIELE D. & BALJER G. (1998). Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiol Infect.*, **120**, 157–164.

73. JONES P.W., DOUGAN G., HAYWARD C., MACKENSIE N., COLLINS P. & CHATFIELD S.N. (1991). Oral vaccination of calves against experimental salmonellosis using a double *aro* mutant of *Salmonella typhimurium*. *Vaccine*, **9**, 29–34.
74. JUNGBLUT P.E., SIMNY-ARNDT U., ZEINDL-EBERHART E., STULIK J., KOUPILOVA K., PLEISSNER K.P., OTTO A., MULLER E.C., SOKOLOWSKA-KOHLER W., GRABHER G. & STOFFLER G. (1999). Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis*, **20**, 2100–2110.
75. KAASHOEK M.J., MOERMAN A., MADIC J., RIJSEWIJK F.A., QUAK J., GIELKENS A.L. & VAN OIRSCHOT J.T. (1994). A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine*, **12**, 439–444.
76. KAASHOEK M.J., MOERMAN A., MADIC J., WEERDMEESTER K., MARIS-VELDHUIS M., RIJSEWIJK F.A. & VAN OIRSCHOT J.T. (1995). An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine*, **13**, 342–346.
77. KAPPMAYER L.S., PERRYMAN L.E., HINES S.A., BASZLER T.V., KATZ J.B., HENNAGER S.G. & KNOWLES D.P. (1999). Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. Caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 2285–2290.
78. KNOWLES D.P., KAPPMAYER L.S., STILLER D., HENNAGER S.G. & PERRYMAN L.E. (1992). Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 3122–3126.
79. KUNDIG T.M., KALBERER C.P., HENGARTNER H. & ZINKERNAGEL R.M. (1993). Vaccination with two different vaccinia recombinant viruses: long-term inhibition of secondary vaccination. *Vaccine*, **11**, 1154–1158.
80. LEUNEN J. & STROBBE R. (1977). Capacity of attenuated swine fever vaccines to prevent virus carriers in the vaccinated pigs, after contact with field virus. *Arch. Exp. Vet. Med.*, **31**, 533–536.
81. LEWIN S., SCHONIAN G., EL TAI N., OSKAM L., BASTIEN P. & PRESBER W. (2002). Strain typing in *Leishmania donovani* by using sequence-confirmed amplified region analysis. *Int. J. Parasitol.*, **32**, 1267–1276.
82. LI H., DYER N., KELLER J. & CRAWFORD T.B. (2000). Newly recognized herpesvirus causing malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1313–1318.
83. LI H., MCGUIRE T.C., MULLER-DOBLIES U.U. & CRAWFORD T.B. (2001). A simpler, more sensitive competitive inhibition ELISA for detection of antibody to malignant catarrhal fever viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 361–364.
84. LI H., SHEN D.T., KNOWLES D.P., GORHAM J.R. & CRAWFORD T.B. (1994). Competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in sheep and other ruminants to a conserved epitope of malignant catarrhal fever virus. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1674–1679.
85. LIBEAU G., DIALLO A., COLAS F. & GUERRE L. (1994). Rapid differential diagnosis of rinderpest and pestes des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Vet. Rec.*, **134**, 300–304.
86. LICHTENSTEIGER C.A., KNOWLES D.P., MCGUIRE T.C. & CHEEVERS W.P. (1991). Recombinant gp135 envelope glycoproteins of caprine arthritis-encephalitis lentivirus variants inhibit homologous and heterologous variant-specific neutralizing antibodies. *Virology*, **185**, 2–9.
87. LIU M., WOOD J.M., ELLIS T., KRAUSS S., SEILER P., JOHNSON C., HOFFMANN E., HUMBERD J., HULSE D., ZHANG Y., WEBSTER R.G. & PEREZ D.R. (2003). Preparation of a standardized, efficacious agricultural H5N3 vaccine by reverse genetics. *Virology*, **314**, 580–590.
88. LOEHR B.I., WILLSON P., BABIUK L.A. & VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK S. (2000). Gene gun-mediated DNA immunization primes development of mucosal immunity against bovine herpesvirus 1 in cattle. *J. Virol.*, **74**, 6077–6086.
89. LOZA-RUBIO E., AGUILAR-SETIÉN A., BAHLOUL CH., BROCHIER B., PASTORET P.P. & TORDO N. (1999). Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico. *Arch. Med. Res.*, **30**, 144–149.
90. LYOY Y.S., KLEIBOEKER S.B., JANG K.Y., SHIN N.K., KANG J.M., KIM C.H., LEE S.J. & SUR J.H. (2005). A simple and rapid chromatographic strip test for detection of antibody to porcine reproductive and respiratory

91. MANOJ S., GRIEBEL P.J., BABIUK L.A. & VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK S. (2003). Targeting with bovine CD154 enhances humoral immune responses induced by a DNA vaccine in sheep. *J. Immunol.*, **170**, 989–996.
92. MARRA M.A., JONES S. J., ASTELL C.R., ET AL. (2003). The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*, **300**, 1399–1404.
93. MELOEN R.H. (1997). Synthetic peptide vaccines. *In: Veterinary Vaccinology*, Pastoret P.-P., Blancou J., Vannier P. & Verschueren C., eds. Elsevier Science BV, Amsterdam, the Netherlands, 272–276.
94. MIGNON B., DUBUISSON J., BARANOWSKI E., KOROMYSLOV I., ERNST E., BOULANGER D., WAXWEILER S. & PASTORET P.P. (1991). A monoclonal ELISA for bovine viral diarrhoea pestivirus antigen detection in persistently infected cattle. *J. Virol. Methods*, **35**, 177–188.
95. MOLINA CABALLERO J.M., ANGUIANO A., FERRER O., SERRANO E. & UCEDA A. (1993). Use of an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of clinical paratuberculosis in goats. Study by western blotting of false-positive reactions. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12**, 629–638.
96. MOSS B. (1996). Poxviridae: the viruses and their replication. *In: Fields Virology*, Fields B., Knipe D.M. & Howley P.M., editors. Lippincott Raven Press, New York, USA, 2637–2671.
97. Moynag J., Schimmel H. Kramer G.N. (1999). Report on the Evaluation of Tests for the Diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathy in Bovines. July 8 1999, European Commission, Directorate-General XXIV, Consumer Policy and Consumer Health Protection, Directorate B – Scientific Health Opinions, Unit B3 – Management of Scientific Committees II, Brussels Belgium. Available at: http://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse12_en.pdf
98. MUJER V.C., WAGNER M.A., ESCHENBRENNER M., HORN T., KRAYCER J.A., REDKAR R., HAGIOUS S., ELZER P. & DELVECCHIO V.G. (2002). Global analysis of *Brucella melitensis* proteomes. *Ann. NY Acad. Sci.*, **969**, 97–101.
99. MULLIS K.B., FERRE F. & GIBBS R.A., EDS (1994). PCR: The Polymerase Chain Reaction. Birkhäuser Boston, Cambridge, USA.
100. NAIR V. (2004). Successful control of Marek's disease by vaccination. *Dev. Biol. (Basel)*, **119**, 147–154.
101. NEUMANN G., HATTA M. & KAWAOKA Y. (2003). Reverse genetics for the control of avian influenza. *Avian Dis.*, **47**, 882–887.
102. NIELSEN K., GALL D., SMITH P., BALSEVICIUS S., GARRIDO F., FERRER M.D., BIANCIFIORI F., DAJER A., LUNA E., SAMARTINO L., BERMUDEZ R., MORENO F., RENTERIA T. & CORRAL A. (2004). Comparison of serological tests for the detection of ovine and caprine antibody to *Brucella melitensis*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **23**, 979–987.
103. NIELSEN K., GALL D., SMITH P., VIGLIOCCO A., PEREZ B., SAMARTINO L., NICOLETTI P., DAJER A., ELZER P. & ENRIGHT F. (1999). Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, **68** (3-4), 245–253.
104. NIELSEN K., KELLY L., GALL D., NICOLETTI P. & KELLY W. (1995). Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **46**, 285–291.
105. NIELSEN O., STEWART R.E.A., NIELSEN K., MEASURES L. & DUIGNAN P. (2001). Serologic survey of *Brucella* spp. antibodies in some marine mammals of North America. *J. Wildl. Dis.*, **37**, 89–100.
106. NOBIRON I., THOMPSON I., BROWNLIE J. & COLLINS M.E. (2003). DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge.
107. O'ROURKE K.I., BASZLER T.V., PARISH S.M. & KNOWLES D.P. (1998). Preclinical detection of PrP^{Sc} in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. *Vet. Rec.*, **142**, 489–491.
108. OBERT G. & BEYER C. (1988). An enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies for the detection of respiratory syncytial virus in clinical specimens. *Arch. Virol.*, **100**, 37–49.
109. OHISHI K., INUI K., BARRETT T. & YAMANOUCHI K. (2000). Long-term protective immunity to rinderpest in cattle following a single vaccination with a recombinant vaccinia virus expressing the virus haemagglutinin protein. *J. Gen. Virol.*, **81**, 1439–1446.

110. OSHOP G.L., ELANKUMARAN S. & HECKERT R.A. (2002). DNA vaccination in the avian. *Vet. Immunol. Immunopath.*, **89**, 1–12.
111. PAIBA G.A., ANDERSON J., PATON D.J., SOLDAN A.W., ALEXANDERSEN S., CORTEYN M., WILSDEN G., HAMBLIN P., MACKAY D.K.J. & DONALDSON A.I. (2004). Validation of a foot and mouth disease antibody screening solid-phase competition ELISA (SPCE). *J. Virol. Methods*, **115**, 145–158.
112. PAOLETTI E., TARTAGLIA J. & TAYLOR J. (1994). Safe and effective poxvirus vectors – NYVAC and ALVAC. *Dev. Biol. Stand.*, **82**, 65–69.
113. PAOLETTI E., TAYLOR J., MEIGNIER B., MERIC C. & TARTAGLIA J. (1995). Highly attenuated poxvirus vectors: NYVAC, ALVAC and TROVAC. *Dev. Biol. Stand.*, **84**, 159–163.
114. PASTORET P.P. (2001). International harmonisation of vaccine standards (equine influenza vaccines, inactivated). *In: Proceedings, Quality Control of Equine Influenza Viruses*, 10–11 December 2001, Budapest, Hungary, 69–78.
115. PASTORET P.P., BABIUK L.A., MISRA V. & GRIEBEL P. (1980). Reactivation of temperature-sensitive and non-temperature-sensitive infectious bovine rhinotracheitis vaccine virus with dexamethasone. *Infect. Immun.*, **29**, 483–488.
116. PASTORET P.P., BROCHIER B., BLANCOU J., ARTOIS M., AUBERT M., KIENY M.P., LECOCQ J.P., LANGUET P., CHAPPUIS G. & DESMETTRE P. (1992). Development and deliberate release of a vaccinia-rabies recombinant virus for the oral vaccination of foxes against rabies. *In: Recombinant Poxviruses*, Binns M.M., Smith G.L., eds. CRC Press, Boca Raton, USA.
117. PASTORET P.P. & BROCHIER B. (1996). The development and use of vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies: a link between Jenner and Pasteur. *Epidemiol. Infect.*, **116**, 235–240.
118. PASTORET P.P., BROCHIER B., LANGUET B., THOMAS I., PAQUOT A., BAUDUIN B., KIENY M.P., LECOCQ J.P., DEBRUYN J., COSTY F., ANTOINE H. & DESMETTRE P. (1988). First field trial of fox vaccination against rabies with a vaccinia-rabies recombinant virus. *Vet. Rec.*, **123**, 481–483.
119. PASTORET P.P., THIRY E., BROCHIER B., DERBOVEN G. & VINDEVOGEL H. (1984). The role of latency in the epizootiology of infectious bovine rhinotracheitis. *In: Latent Herpesvirus Infections in Veterinary Medicine*, Wittmann G., Gaskell R.M., Rziha H.J., eds. Martinus Nijhoff Publishers for the Commission of the European Communities.
120. PASTORET P.P., THIRY E. & THOMAS R. (1986). Logical description of bovine herpesvirus 1 latent infection. *J. Gen. Virol.*, **67**, 885–897.
121. PASTORET P.P. & VANDERPLASSCHEN A. (2003). Poxviruses as vaccine vectors. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **26**, 343–355.
122. PERKUS M.E., GOEBEL S.J., DAVIS S.W., JOHNSON G.P., NORTON E.K. & PAOLETTI E. (1991). Deletion of 55 open reading frames from the termini of vaccinia virus. *Virology*, **180**, 406–410.
123. PERKUS M.E., PICCINI A., LIPINSKAS B.R. & PAOLETTI E. (1985). Recombinant vaccinia virus: immunization against multiple pathogens. *Science*, **229**, 981–984.
124. PETHERBRIDGE L., HOWES K., BAIGENT S.J., SACCO M.A., EVANS S., OSTERRIEDER N. & NAIR V. (2003). Replication-competent bacterial artificial chromosomes of Marek's disease virus: novel tools for generation of molecularly defined herpesvirus vaccines. *J. Virol.*, **77**, 8712–8718.
125. PINES O. & INOUE M. (1999). Expression and secretion of proteins in *E. coli*. *Mol. Biotechnol.*, **12**, 25–34.
126. PONTAROLLO R.A., BABIUK L.A., HECKER R. & VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK S. (2002). Augmentation of cellular immune responses to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D by vaccination with CpG-enhanced plasmid vectors. *J. Gen. Virol.*, **83**, 2973–2981.
127. PRÉCAUSTA P., BRUN A., KATO F., TERRE J. & MARCON C. (1975). Peste porcine classique. Etude d'un vaccin préparé à partir de la souche chinoise CL adaptée à la culture cellulaire. *Revue méd. Vét.*, **126**, 969–981.
128. PROCOP G.W. & WILSON M. (2001). Infectious disease pathology. *Clin. Infect. Dis.*, **32**, 1589–1601.
129. RAMIREZ J.C., GHERARDI M.M., RODRIGUEZ D. & ESTEBAN M. (2000). Attenuated modified vaccinia virus ankara can be used as an immunizing agent under conditions of pre-existing immunity to the vector. *J. Virol.*, **74**, 7651–7655.

130. RAPPUOLI R. & COVACCI A. (2003). Reverse vaccinology and genomics. *Science*, **302**, 602.
131. RASMUSSEN H.H., JI H., WOLF H. & CELIS J.E. (1996). Towards a comprehensive database of proteins from the urine of patients with bladder cancer. *J. Urology*, **155**, 2113–2119.
132. RISATTI G.R., CALLAHAN J.D., NELSON W.M. & BORCA M.V. (2003). Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 500–505.
133. ROBINSON H.L. (1997). Nucleic acid vaccines: an overview. *Vaccine*, **15**, 785–787.
134. ROUT M.P. & FIELD M.C. (2001). Isolation and characterization of subnuclear compartments from *Trypanosoma brucei*. Identification of a major repetitive nuclear lamina component. *J. Biol. Chem.*, **276**, 38261–38271.
135. ROY P., FRENCH T.J.R. & ERASMUS B.J. (1992). Protective efficacy of virus-like particles for bluetongue disease. *Vaccine*, **10**, 28–32.
136. RUMENAF T., STARK R., MEYERS G. & THIEL H.J. (1991). Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J. Virol.*, **65**, 589–597.
137. SAFAR J.G., SCOTT M., MONAGHAN J., DEERING C., DIDORENKO S., VERGARA J., BALL H., LEGNAME G., LECLERC E., SOLFOROSI L., SERBAN H., GROTH D., BURTON D.R., PRUSINER S.B. & WILLIAMSON R.A. (2002). Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1147–1150.
138. SAIKI R., GEFLAND D., STOFFEL S., SCHANF S., HIGUCHI R., HORN G., MULLIS K. & ERLICH H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487–491.
139. Salt J.S. (1997). Vaccination against foot and mouth disease, *In* Veterinary Vaccinology, Pastoret P.P., Blancou P., Vannier C. & Verschueren C., eds. Elsevier Science, Amsterdam, 641–652.
140. SANDVIK T. & KROGSRUD J. (1995). Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle blood samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**, 65–71.
141. SARON M.F., FAYOLE C., SEBO P., LADANT D., ULLMANN A. & LECLERC C. (1997). Anti-viral protection conferred by recombinant adenylate cyclase toxins from *Bordetella pertussis* carrying a CD8+ T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **94**, 3314–3319.
142. SCHALLER O., FATZER R., STACK M., CLARK J., COOLEY W., BIFFIGER K., EGLI S., DOHERR M., VANDELDELDE M., HEIM D., OESCH B. & MOSER M. (1999). Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP^{Sc} detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **98**, 437–443.
143. SCHWEIGER B., PAULI G., ZEICHHARDT H. & KUCHERER C. (1997). A multicentre quality assessment study to monitor the performance of HIV-1 PCR. *J. Virol. Methods*, **67**, 45–55.
144. SEDLIK C., SARON M., SARRASECA J., CASAL I. & LECLERC C. (1997). Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **94**, 7503–7508.
145. SMITH B.P., REINA-GUERRA M., STOCKER B.A., HOISETH S.K. & JOHNSON E. (1984). Aromatic-dependent *Salmonella dublin* as a parenteral modified live vaccine for calves. *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 2231–2235.
146. SMITH G.L., MACKETT M. & MOSS B. (1983). Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis b virus surface antigen. *Nature*, **302**, 490–495.
147. SMITH G.L., MURPHY B.R. & MOSS B. (1983). Construction and characterisation of an infectious vaccinia virus recombinant that expresses the influenza haemagglutinin gene and induces resistance to influenza virus infection in hamsters. *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **80**, 7155–7159.
148. SMITH H.W. (1965). The immunization of mice, calves and pigs against *Salmonella dublin* and *Salmonella cholera-suis* infections. *J. Hyg. Cam.*, **63**, 117–135.
149. SPANO F., PUTIGNANI L., MCLAUCHLIN J., CASEMORE D.P. & CRISANTI A. (1997). PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol. Lett.*, **150**, 209–217.

150. STACK M.J., CHAPLIN M.J. & CLARK J. (2002). Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1), bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **104**, 279–286.
151. STEWART L.M.D. & POSSEE R.D. (1993). Baculovirus expression vectors. *In: Molecular Virology*, Davison A.J. & Elliot R.M., eds. Oxford University Press, UK, 227–254.
152. STREATFIELD S.J. & HOWARD J.A. (2003). Plant-based vaccines. *Int. J. Parasitol.*, **33**, 479–493.
153. STROBBE R. (1992). Diminution de l'immunité du cheptel bovin belge après l'arrêt de la vaccination antiaphteuse et conditions d'une vaccination d'urgence. *Ann. Méd. Vét.*, **136**, 513–519.
154. SUTER M., LEW A.M., GROB P., ADEMA G.J., ACKERMANN M., SHORTMAN K. & FRAEFEL C. (1999). BAC-VAC, a novel generation of (DNA) vaccines: A bacterial artificial chromosome (BAC) containing a replication-competent, packaging-defective virus genome induces protective immunity against herpes simplex virus 1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 12697–12702.
155. TARTAGLIA J., COX W.I., PINCUS S. & PAOLETTI E. (1994). Safety and immunogenicity of recombinants based on the genetically-engineered vaccinia strains, NYVAC. *Dev. Biol. Stand.*, **82**, 125–129.
156. TARTAGLIA J., PERKUS M.E., TAYLOR J., NORTON E.K., AUDONNET J.C., COX W.I., DAVIS S.W., VAN DER HOEVEN J., MEIGNIER B., RIVIERE M. ET AL. (1992). NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology*, **188**, 217–232.
157. TAYLOR J. & PAOLETTI E. (1988). Fowlpox virus as a vector in non-avian species. *Vaccine*, **6**, 466–468.
158. TAYLOR J., TRIMARCHI C., WEINBERG R., LANGUET B., GUILLEMIN F., DESMETTRE P. & PAOLETTI E. (1991). Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. *Vaccine*, **9**, 190–193.
159. THOMAS I., BROCHIER B., LANGUET B., BLANCOU J., PEHARPRE D., KIENY M.P., DESMETTRE P., CHAPPUIS G. & PASTORET P.P. (1990). Primary multiplication site of the vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus administered to foxes by the oral route. *J. Gen. Virol.*, **71**, 37.
160. THORGEIRSDOTTIR S., GEORGSSON G., REYNISSON E., SIGURDARSON S. & PALSDOTTIR (2002). A search for healthy carriers of scrapie: an assessment of subclinical infection in an Icelandic scrapie flock by three diagnostic methods and correlation with PRP genotypes. *Arch. Virol.*, **147**, 709–722.
161. TIBBETTS S.A., MCCLELLAN J.S., GANGAPPA S., SPECK S.H. & VIRGIN H.W. (2003). Effective vaccination against long-term gammaherpesvirus latency. *J. Virol.*, **77**, 2522–2529.
162. TORIONI DE E.S., KNOWLES D.P., MCGUIRE T.C., PALMER G.H., SUAREZ C.E. & McELWAIN T.F. (1998). Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 777–782.
163. TORTORELLA D., GEWURZ B.E., FURMAN M.H., SCHUST D.J. & PLOEGH H.L. (2000). Viral subversion of the immune system. *Ann. Rev. Immunol.*, **18**, 861–926.
164. TRUEBLOOD E.S., MCGUIRE T.C. & PALMER G.H. (1991). Detection of *anaplasma marginale* rickettsemia prior to onset of clinical signs by using an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 1542–1544.
165. ULRICH T., MUNK M.E., MOLLENKOPF H., ET AL. (1998). Differential T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors. *Eur. J. Immunol.*, **28**, 3949–3958.
166. UMTUN A.R. & MENGELING W.L. (1999). Restriction fragment length polymorphism analysis of strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by use of a nested-set reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.*, **60**, 802–806.
167. UTTENTHAL A., LEPOITIER M.F., ROMERO L., DEMIA G.M. & FLOEGEL-NIESMANN G. (2001). Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial I. Challenge studies in weaner pigs. *Vet. Microbiol.*, **83**, 85–106.
168. VALARCHER J.F., FURZE J., WYLD S., COOK R., CONZELMANN K.K. & TAYLOR G. (2003). Role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins. *J. Virol.*, **77**, 8426–8439.

169. VAN OIRSCHOT J.T., GIELKENS A.L.J., MOORMANN R.J.M. & BERNIS A.J.M. (1990). Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Vet. Microbiol.*, **23**, 85–101.
170. VAN OIRSCHOT J.T., KAASHOEK M.J. & RIJSEWIJK F.A.M. (1996). Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet. Microbiol.*, **53**, 43–54.
171. VAN ROOIJ E.M., GLANSBEEK H.L., HILGERS L.A., TE LINTELO E.G., DE VISSER Y.E., BOERSMA W.J., HAAGMANS B.L. & BIANCHI A.T. (2002). Protective antiviral immune responses to pseudorabies virus induced by DNA vaccination using dimethyldioctadecylammonium bromide as an adjuvant. *J. Virol.*, **76**, 10540–10545.
172. VAN ZIJL M., WENSVOORT G., DE KLUYVER E., HULST M., VANDER G.H., GIELKENS A., BERNIS A. & MOORMANN R. (1991). Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J. Virol.*, **65**, 2761–2765.
173. VANDEVANTER D.R., WARRENER P., BENNETT L., SCHULTZ E.R., COULTER S., GARBER R.L. & ROSE T.M. (1996). Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 1666–1671.
174. VILLARREAL-RAMOS B., MANSEER J., COLLINS R.A., DOUGAN G., CHATFIELD S.N. & HOWARD C. (1998). Immune responses in calves immunised orally or subcutaneously with a live *Salmonella typhimurium* aro vaccine. *Vaccine*, **16**, 45–54.
175. VORDERMEIER H.M., LOWRIE D.B. & HEWISON R.G. (2003). Improved immunogenicity of DNA vaccination with mycobacterial HSP65 against bovine tuberculosis by protein boosting. *Vet. Microbiol.*, **93**, 349–359.
176. VORDERMEIER H.M., WHELAN A., COCKLE P.J., FARRANT L., PALMER N. & HEWINSON R.G. (2001). Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 571–578.
177. WAGNER M., RUZSICS Z. & KOSZINOWSKI U.H. (2002). Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol.*, **10**, 318–324.
178. WANG D., COSCOY L., ZYLBERBERG M., AVILA P.C., BOUSHEY H.A., GANEM D & DERISI J.L. (2002). Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **99**, 15687–15692.
179. WEIDMANN M., MEYER-KONIG U. & HUFERT F.T. (2003). Rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections by real-time pcr. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1565–1568.
180. WELTER J., TAYLOR J., TARTAGLIA J., PAOLETTI E. & STEPHENSEN C.B. (2000). Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. *J. Virol.*, **74**, 6358–6367.
181. WENSVOORT G., BLOEMRAAD M. & TERPSTRA C. (1988). An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, **17**, 129–140.
182. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (1993). Biotechnology applied to the diagnosis of animal diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12** (2), 313–672.
183. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (1990). Biotechnology and veterinary science. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **9** (3), 611–916.
184. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2007). Looking to the Future: Potential Nanotech Applications. OIE *Bulletin*, December 2007.
185. XIANG Z. & ERTL C.J. (1995). Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity*, **2**, 129–135.
186. YATSUDA A.P., KRIJGSVELD J., CORNELISSEN A.W., HECK A.J. & DE VRIES E. (2003) comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite *Haemonchus contortus* reveals extensive sequence variation and differential immune recognition. *J. Biol. Chem.*, **278**, 16941–16951.

*
* *

PRINCIPES DE PRODUCTION DES VACCINS VÉTÉRINAIRES

RÉSUMÉ

La mise sur le marché de vaccins vétérinaires purs, efficaces et ayant une bonne innocuité est essentielle pour maintenir un bon état sanitaire de l'élevage ainsi que pour la réalisation des programmes de contrôle de la santé animale. La vaccination des animaux avec des vaccins de haute qualité est la première méthode pour contrôler de nombreuses infections animales. Dans d'autres cas, les vaccins sont utilisés en conjonction avec des programmes nationaux de contrôles ou d'éradications des maladies.

Les exigences et procédures décrites ici sont générales et sont en accord avec les normes publiées qui sont généralement disponibles sous forme de guide de bonne fabrication des vaccins vétérinaires. L'approche pour garantir la pureté, l'innocuité et l'efficacité des vaccins vétérinaires peut varier d'un pays à l'autre en fonction des besoins locaux. Cependant, des normes adaptées et des systèmes de contrôle de production sont essentiels pour garantir la permanence de produits de haute qualité pouvant être utilisés dans des programmes de contrôle de la santé animale.

Comme la pathogénie et l'épidémiologie de chaque maladie varient, le rôle et l'efficacité des vaccins en termes de contrôle varient également d'une maladie à l'autre. Certains vaccins peuvent être très efficaces, induisant une immunité qui non seulement prévient les signes cliniques de la maladie, mais peut aussi empêcher l'infection et réduire la réplication et le portage de l'agent causal. D'autres vaccins peuvent prévenir la maladie clinique sans empêcher l'infection et/ou le développement d'un état de porteur latent. Dans d'autres cas, l'immunisation est complètement inefficace ou peut seulement réduire la gravité de la maladie. Aussi la décision de recommander telle vaccination comme partie d'une stratégie de lutte contre une maladie animale requiert-elle une connaissance approfondie de l'agent causal et de son épidémiologie ainsi que des caractéristiques et qualités des différents vaccins disponibles. Il existe également un intérêt croissant du public en ce qui concerne les conséquences bénéfiques pour le bien être animal de l'utilisation des vaccins comme outil de contrôle des maladies. Quel que soit le choix de la stratégie, si des vaccins sont utilisés, la réussite de l'opération requiert une production uniforme et de bonne qualité.

NOMENCLATURE

La nomenclature pour les produits biologiques vétérinaires varie d'un pays à un autre. Aux États-Unis d'Amérique (USA) le terme « vaccin » est utilisé pour les produits contenant des virus atténués ou inactivés, des protozoaires, des bactéries vivantes, ou des acides nucléiques. Les produits contenant des bactéries tuées et d'autres micro-organismes sont classés en bactérines (vaccins bactériens inactivés), extraits bactériens, vaccin à sous-unités conventionnelles ou recombinées, anatoxine, bactéries tuées/anatoxines, en fonction du type d'antigène présent. Les produits contenant des composants antigéniques ou immunogènes de micro-organismes peuvent être appelés vaccin sous-unités ou extraits bactériens, et ceux qui sont produits par l'inactivation de toxine, anatoxine. Au sein de l'Union Européenne (UE), les Produits médicaux immunologiques à usage vétérinaire se définissent comme des « produits administrés aux animaux pour induire une immunité passive ou active ou pour diagnostiquer le statut immunitaire » (lire la Directive 2001/82/CE, modifiée par la Directive 2004/28/CE.). Toutefois, dans ce chapitre, le terme « vaccin » inclura tous les produits permettant une immunisation active des animaux vis-à-vis de maladies, indépendamment de la nature du micro-organisme ou de la toxine microbienne à partir desquels ils dérivent ou qui les constitue. Cet usage est plus en accord avec la nomenclature internationale. Le terme « vaccin » ne sera donc pas utilisé ici pour désigner des produits biologiques permettant une immunisation passive, une immunomodulation, un traitement d'allergie ou un diagnostic.

PRÉSENTATION ET TYPE DE VACCINS

Les vaccins peuvent être vivants ou inactivés. Certains vaccins atténués proviennent d'isolats faiblement virulents de l'agent causal d'une maladie, isolés sur le terrain, présentant une bonne innocuité et qui sont efficaces quand elles sont administrées par une voie non-naturelle ou dans des conditions spéciales permettant d'immuniser plutôt que de produire une maladie. Les autres vaccins vivants sont préparés à partir d'isolats virulents atténués par passage sur animal de laboratoire, culture cellulaire ou œufs embryonnés afin de sélectionner un variant de virulence réduite. Le développement des techniques de l'ADN recombiné (ADNrec) ont apporté des solutions originales à la production de vaccins. Des vaccins vivants modifiés peuvent maintenant être produits spécifiquement par délétion de gènes reliés à la virulence d'un micro-organisme. D'autres sont produits par insertion de gènes d'un micro-organisme causant une maladie et codant des immunogènes spécifiques, dans un vecteur avirulent dérivant d'un autre micro-organisme. Des vaccins à base d'acides nucléiques et contenant seulement de l'ADN plasmidique sont en cours de développement. Ils sont habituellement constitués de plasmide(s) codant des immunogènes provenant du micro-organisme responsable de la maladie.

Les produits inactivés peuvent contenir : 1) des cultures de micro-organismes qui ont été inactivés par un agent chimique ou un autre procédé ; 2) des toxines inactivées ; ou 3) des sous-unités antigéniques (fractions antigéniques de micro-organismes) qui ont été extraites de cultures ou qui ont été produites en utilisant un ADNrec.

Les vaccins vivants ou inactivés peuvent être formulés avec des adjuvants destinés à augmenter leur efficacité. Les adjuvants fréquemment utilisés sont typiquement des émulsions « eau dans huile » (soit simples ou doubles), préparées avec de l'huile végétale ou minérale et un agent émulsifiant. D'autres adjuvants tels que le gel d'hydroxyde d'aluminium et la saponine sont également utilisés. En plus de ces adjuvants traditionnels, des vaccins sont mis au point actuellement qui comprennent des ingrédients supplémentaires ayant des effets immunomodulateurs chez l'animal-hôte et qui servent à augmenter l'efficacité du vaccin. Ces ingrédients peuvent être soit des composants immunogéniques dérivés de bactéries tuées, qui stimulent la réponse immunitaire vis-à-vis d'autres fractions contenues dans le vaccin, soit des cytokines, utilisées pour réguler des aspects spécifiques du système immunitaire et qui sont incluses dans des produits obtenus par génie génétique.

ASSURANCE QUALITÉ

Une production cohérente de vaccins purs, sûrs, actifs et efficaces requiert des procédures d'assurance qualité pour permettre un procédé de fabrication uniforme et constant. Comme les procédés de production de vaccins génèrent un grand risque de variabilité, une attention particulière doit être prise pour contrôler l'évolution de cette variabilité, en utilisant de préférence des procédures validées. De même, le produit devra être protégé de toute contamination pendant tous les stades de la production.

La pureté, l'efficacité, l'activité et l'innocuité vaccinale doivent être vérifiées au cours du procédé de fabrication. Une qualité de produit cohérente (uniformité et constance des lots) doit être construite à chaque étape. Les tests sur le produit fini sont utilisés afin de vérifier que les contrôles pendant les procédés de fabrication ont bien été effectués et que le produit commercialisé satisfait le cahier des charges convenu avec l'autorité délivrant la licence du produit.

Les autorités réglementaires de différents pays ont développé différentes approches pour garantir la qualité des vaccins. En dehors de leurs objectifs ultimes communs, ces systèmes varient, certains insistant plus sur les procédés de fabrication (normes de fabrication) et d'autres plus sur les contrôles des produits finis (normes de performances). Les procédures de contrôle sélectionnées seront celles qui s'adaptent le mieux aux conditions de fabrication du vaccin et doivent, lorsque cela est possible, respecter les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

Les normes de contrôle et les procédures établies pour un produit définissent le risque ou la possibilité de mettre sur le marché un produit sans valeur, contaminé, dangereux ou nocif. Le degré d'acceptabilité de ce risque dépend du rapport « coût de la maladie sur bénéfice retiré de la vaccination ». Ces normes peuvent varier d'un pays à l'autre ou d'un produit à l'autre en fonction de la situation zoonositaire locale. Cependant, les autorités de contrôle doivent s'efforcer d'établir des normes de contrôle ainsi que des procédures qui assurent que le produit fini ait, la pureté, l'innocuité, l'activité et l'efficacité les plus hautes possibles.

Le système d'assurance-qualité optimale concerne à la fois les procédures de production et le produit final évalué. Un système « risque zéro » permettant de mettre sur le marché seulement des produits satisfaisants entraînerait un surcoût de production et de contrôle incompatible avec la demande du terrain. Ainsi, les autorités de contrôle et les producteurs de vaccin doivent choisir des procédures de contrôle capables de générer un niveau acceptable de risque par rapport au danger encouru. De telles procédures ne doivent toutefois pas être

pesantes au point de limiter le développement ou la disponibilité de produits nécessaires à des méthodes prophylactiques dont le coût doit rester acceptable par le consommateur.

INSTALLATIONS NÉCESSAIRES POUR LA PRODUCTION

Les installations utilisées pour la production des vaccins doivent être prévues pour maintenir la pureté du produit tout au long de la chaîne de production et pour préserver la santé du personnel. Elles doivent être disposées de telle sorte que : 1) les surfaces peuvent être facilement nettoyées à fond ; 2) une séparation adéquate des salles de préparation est prévue ; 3) une ventilation appropriée existe ; 4) l'eau froide et l'eau chaude sont mises à disposition avec des systèmes appropriés d'évacuation ; et 5) des vestiaires et d'autres pièces nécessaires pour le personnel sont prévus avec un accès direct sans passage par la zone de production des produits biologiques. Les installations doivent être adaptées aux différents besoins de la production comme : le stockage des lots de semences primaires, des matières premières et autres substances nécessaires à la production ; la préparation des milieux de culture et des cultures cellulaires ; la préparation de la verrerie et l'équipement de production ; l'inoculation, l'incubation et la récolte des cultures ; le stockage des produits en cours d'élaboration ; l'inactivation, la centrifugation, l'addition d'adjuvant et la formulation des produits ; le remplissage, la lyophilisation, le sertissage des flacons, la pose d'étiquettes et le stockage du produit fini ; la réalisation des contrôles de qualité en cours de fabrication et sur le produit fini ; ainsi que la recherche et le développement.

Des zones séparées pour les différentes activités sont généralement requises. Toutes les pièces et les systèmes de ventilation doivent être disposés de façon à éviter toute contamination croisée d'un secteur de production à l'autre ou d'empêcher une contamination par le personnel ou les installations. Les micro-organismes virulents et dangereux doivent être préparés et stockés dans des pièces séparées du reste de l'établissement. En particulier, les organismes d'épreuve doivent être séparés des souches vaccinales. Tout équipement entrant au contact du produit en cours d'élaboration doit être stérilisé selon des procédures validées.

Les installations de production doivent être conçues de telle sorte qu'une contamination de l'environnement extérieur soit évitée. Tout matériel utilisé au cours de la production doit être inactivé avant de quitter l'installation. Si des micro-organismes hautement contagieux sont propagés, l'air expulsé doit être traité afin de prévenir l'échappement des agents infectieux. Lorsqu'il quitte les installations de production, le personnel doit suivre des procédures de sécurité telles que se doucher et éviter tout contact avec des animaux sensibles.

Bien que la qualité et les dispositions des installations de production puissent varier de façon significative, elles doivent toujours satisfaire aux normes considérées comme étant appropriées pour les vaccins devant être produits. Par exemple, les installations requises pour la production de vaccins sur embryons de poulet pour administration à des poulets par voie orale, intra-nasale ou intra-oculaire, peuvent ne pas réclamer autant de conditions que les vaccins produits en culture cellulaire et administrés par voie intramusculaire ou par voie sous-cutanée, requièrent.

PLAN DES INSTALLATIONS

Pour chaque vaccin effectué dans une installation, un plan détaillé décrivant chaque étape de la production doit être réalisé. Ce plan doit être décrit selon les Procédures Opératoires Normalisées (PON) ou par un plan simplifié du bâtiment accompagné de sa légende. Chaque pièce de l'établissement doit être clairement référencée et toutes les fonctions et micro-organismes manipulés doivent être spécifiés pour chaque local identifié. Les procédures de désinfection, le contrôle de l'appareillage, et les autres procédures utilisées en cours de fabrication pour éviter toute contamination ou erreurs doivent être décrites. Ce plan de fabrication doit être actualisé dès lors que de nouveaux systèmes ou de nouveaux micro-organismes sont ajoutés aux installations, ou quand sont appliqués d'autres changements ou améliorations des procédures.

DOCUMENTATION DU PROCÉDÉ DE FABRICATION

Un plan détaillé de l'ensemble de la production, une série de PON et d'autres documents doivent être préparés pour décrire le protocole de fabrication et de contrôle de chaque produit dans l'établissement. Les paramètres et les normes pour les matières premières doivent être clairement et précisément documentés. La documentation doit également contenir différentes rubriques comme : l'origine, l'isolement, et le nombre de passages ou de sous-cultures de chaque souche de micro-organisme ; l'origine et la séquence des fragments d'acide nucléique ou des peptides inclus dans les produits obtenus par biotechnologie, y compris les plasmides ou autres vecteurs utilisés dans la construction d'organismes génétiquement modifiés et employés comme lot de semence primaire ; les méthodes pour caractériser les micro-organismes et évaluer leur virulence et pureté ; le milieu ou le système de culture cellulaire utilisé comme semence ou culture de production, en incluant les méthodes utilisées pour démontrer que les milieux sont indemnes de contaminants ; l'origine des matières premières d'origine animale ; les méthodes de stérilisation des milieux ; les conditions de conservation des lignées cellulaires et des cultures de

semence ; la taille et le type des flacons utilisés pour la croissance cellulaire ; les méthodes pour préparer les cultures de semence et l'inoculation des cultures de production ; la durée et les conditions d'incubation ; les observations en cours de croissance ; les critères et spécifications requises pour collecter un matériel satisfaisant ; et les techniques de collecte. Il doit y avoir une documentation sur les mesures mises en place dans l'entreprise afin de minimiser le risque de contamination par les agents des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) dans les matières premières d'origine animale et des procédures pour assurer que le sérum de veau foetal est exempt de pestivirus. Il doit aussi comprendre : une description de tous les tests réalisés pour vérifier la pureté et la qualité du produit ainsi que la présentation de leur mise en œuvre au cours du procédé de fabrication ; chaque étape réalisée pour la formulation du produit fini ; les tests utilisés pour vérifier la pureté, l'innocuité, l'efficacité et tout autre exigence imposée pour chaque lot/série de produit fini ; les spécifications pour terminer le produit, en intégrant la concentration et l'étiquetage avec des indications complètes et les recommandations pour son utilisation ; et la date d'expiration du produit.

Des conseils pour réaliser la préparation de tels documents pour les vaccins vétérinaires sont publiés par les autorités de contrôles compétentes. Cette documentation est destinée à définir le produit et à établir ses spécificités et ses normes. Elle doit être en accord avec les plans des installations et leurs légendes (ou le plan de production et les POS). L'ensemble de la documentation doit montrer que la méthode de production du vaccin est réaliste et uniforme et qu'elle peut être suivie pour la préparation de chaque lot/série.

CONSERVATION DES ENREGISTREMENTS

Le producteur doit réaliser un système d'enregistrement détaillé montrant le suivi des différentes étapes successives de la préparation de chaque produit biologique. Les enregistrements conservés doivent indiquer la date pour chacune des étapes essentielles, le nom de la personne qui a la responsabilité du travail en question, l'identification et la quantité d'ingrédients ajoutés ou enlevés à chaque étape et toute perte ou tout gain quantitatif observé pendant le déroulement du procédé. Les enregistrements doivent être gardés pour tous les tests réalisés sur chaque lot/série. Tous les enregistrements concernant un(e) lot/série doivent être conservés pendant au moins 2 ans après la date d'expiration portée sur l'étiquette du produit ou selon les exigences de l'autorité de contrôle. De plus un enregistrement de toutes les étiquettes utilisées pour tous les produits doit être réalisé ; chaque étiquette est identifiée par son nom, le numéro du produit, le numéro de l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché), la taille du conditionnement et le numéro d'identification de l'étiquette. L'utilisation de toutes les étiquettes imprimées doit être justifiée. Les enregistrements de la stérilisation ou de la pasteurisation doivent être conservés. Ils sont généralement obtenus par des systèmes d'enregistrement automatique. Le producteur doit également conserver les enregistrements complets portant sur les expérimentations animales pendant l'élaboration du produit en incluant le statut sanitaire avant l'utilisation pour les tests, les résultats des tests d'activité, les traitements administrés, les méthodes d'élevage, les résultats d'autopsie et d'élimination des déchets.

LOT DE SEMENCE PRIMAIRE

Le but des tests réalisés sur le lot de semence primaire est de garantir l'innocuité, la qualité et l'efficacité du vaccin. L'innocuité devrait être vérifiée au cours des premières étapes. Un lot de semence primaire doit être établi pour chaque micro-organisme servant à produire une source de matériel biologique pour l'ensemencement des cultures de production. Les lots de semence secondaire ou de travail peuvent être obtenus à partir du lot de semence primaire au moyen de subcultures ; généralement les cultures de production ne doivent pas être distantes de plus de 5 (parfois 10) passages du lot de semence primaire. Le nombre de passages doit être déterminé par les données et désigné dans chaque cas. On favorise l'uniformité et la cohérence du système de production en utilisant un lot de semence primaire et en limitant le nombre de passages des micro-organismes par rapport au lot initial. Des registres de la source de lot de semence primaire doivent être maintenus. Pour les organismes génétiquement modifiés, l'origine du (des) gène(s) pour les antigènes immunogéniques et le micro-organisme vecteur doit être précisée. En outre, la séquence des gènes introduits dans le génome du micro-organisme au cours de la construction doit être indiquée. La semence primaire doit consister en un(e) seul lot/série de semence uniforme homogénéisée puis répartie en flacons. Le lot de semence primaire doit être congelé ou lyophilisé et stocké à température basse telle que -40°C ou -70°C , ou dans d'autres conditions optimales pour maintenir la viabilité. Chaque lot de semence primaire doit être testé pour s'assurer de son identité, innocuité et efficacité. Les lots de semence primaire génétiquement modifiée doivent aussi être testés pour garantir la stabilité et l'innocuité des séquences des gènes insérés. La pureté doit également être établie en contrôlant l'absence de contaminants étrangers bactériens, mycoplasmatiques, viraux ou fongiques.

LOTS PRIMAIRES DE CELLULES

Quand les cultures cellulaires sont utilisées pour préparer un produit biologique, il est nécessaire d'établir une Banque Initiale de Cellules (MCS pour *Master Cell Stock*) pour chaque type de cellules utilisé. Des registres

concernant la source de la Banque Initiale de Cellules doivent être maintenus à jour. Pour chaque produit, les nombres de passage les plus élevés et les plus faibles des cellules pouvant être utilisés pour la production doivent être établis et spécifiés dans les PON ou dans le Protocole général de la Production. Certaines autorités de contrôle ne permettent pas l'utilisation de cellules au delà de 20 à 40 passages. Chaque Banque Initiale doit être caractérisée pour garantir son identité ; sa stabilité génétique doit être démontrée dans la limite des passages autorisés (située entre le nombre minimum et maximum de passages utilisés dans le cadre de la production). Il faut démontrer que le caryotype de la MCS reste stable avec un faible degré de polyploïdie. Des études *in vivo* sur les espèces appropriées, avec les cellules ayant subi le nombre le plus élevé de passages et pouvant être utilisées dans la production, doivent prouver l'absence de pouvoir oncogène ou tumorigène. La pureté des Banques Initiales doit également être établie en contrôlant l'absence de contaminants étrangers bactériens, mycoplasmatiques, viraux ou fongiques.

- **Cellules primaires**

Elles sont définies comme étant un groupe de cellules originales dérivées d'un tissu normal jusqu'au 10^e passage inclus, utilisées pour la production de produits biologiques. Dans le cas de produits utilisés chez les volailles, ces cellules sont habituellement obtenues à partir d'œufs de poule embryonnés et exempts d'agents pathogènes spécifiques qui ont été obtenus sur un lot non vacciné de poules pondeuses soumises à une surveillance microbiologique intense. D'autres cellules primaires sont dérivées de tissus normaux d'animaux sains et sont testées pour la contamination avec une variété large de micro-organismes incluant les bactéries, les champignons, les mycoplasmes et les agents cytopathologiques et/ou hématosorbants ainsi que d'autres virus étrangers. Le risque inhérent d'introduire des agents contaminants étant plus élevé avec les cellules primaires qu'avec les lignées cellulaires, l'utilisation des cellules primaires doit être évitée si des méthodes alternatives existent pour produire des vaccins efficaces. C'est pourquoi certaines autorités de contrôle ne permettent qu'exceptionnellement l'utilisation de cellules primaires.

- **Œufs embryonnés**

Ils sont aussi utilisés communément pour la production de produits biologiques. Dans la plupart des cas, ils doivent dériver de lots de poules exemptes d'agents pathogènes qui ont été surveillés intensivement pour les agents infectieux spécifiques et qui n'ont pas été vaccinées. La voie d'inoculation des œufs ainsi que le choix du matériel issu des œufs sont dépendants de l'organisme qui est propagé.

MATIÈRES PREMIÈRES

Les spécifications et l'origine de toutes les matières premières doivent être définies dans les PON ou le Protocole général de Production, ou dans tout autre document approprié. Le Protocole général de Production doit être approuvé par l'agence nationale délivrant les accords de licence. Tous les produits d'origine animale qui ne sont pas soumis à une procédure de stérilisation validée doivent être contrôlés pour démontrer l'absence de contaminants étrangers bactériens, mycoplasmatiques, viraux ou fongiques. Leur pays d'origine doit être connu. Des mesures doivent être mises en place par l'entreprise afin d'éviter le risque de contamination par les agents des EST dans les matières premières d'origine animale. Certaines autorités de contrôle déconseillent l'utilisation de conservateurs ou (plus important) d'antibiotiques afin de contrôler une contamination éventuelle pendant la production et préfèrent l'utilisation de techniques d'asepsie stricte afin d'assurer la pureté. Cependant, elles permettent parfois l'utilisation de conservateurs en flacons multi-doses pour protéger le produit pendant l'utilisation. Ces autorités de contrôle limitent habituellement toute addition d'antibiotiques dans la fabrication de produit pour les milieux de culture cellulaire et les autres milieux, inoculum d'œufs, et matériel récolté à partir de la peau ou tout autre tissu. Elles permettent normalement l'utilisation d'au maximum 3 antibiotiques pour le même produit. Certaines autorités de contrôle prohibent l'utilisation de pénicilline ou streptomycine dans les vaccins administrés par aérosol ou par voie parentérale. Si les antibiotiques utilisés ne sont pas recommandés pour une utilisation dans l'espèce cible, il doit être démontré qu'ils n'entraînent aucun effet ni chez les animaux vaccinés ni dans les aliments dérivés d'animaux vaccinés.

TESTS D'INNOCUITÉ

L'innocuité intrinsèque des vaccins doit être démontrée au début des étapes de développement et documentée dans le dossier de licence. Pour tous les produits, les études d'innocuité au cours du développement et de la demande de licence doivent comprendre l'innocuité d'une dose unique, d'une surdose et de l'administration répétée d'une seule dose. Des données supplémentaires pour les vaccins vivants doivent être évalués sur la base de tests d'augmentation de la virulence et en évaluant le risque pour l'environnement comme discuté ci-dessous. L'innocuité doit être démontrée pour toutes les espèces pour lesquelles le produit est indiqué. En général, des études avec des surdoses sont requises pour tous les vaccins : 10 fois la dose pour les vaccins vivants et 2 fois la dose pour les vaccins inactivés (si ces études ne sont pas réalisables, une indication de l'innocuité peut être obtenue à partir des résultats des tests d'activité). Pour les vaccins viraux ou bactériens

inactivés, pour lesquels les animaux cibles sont utilisés pour les tests d'activité, l'innocuité peut être évaluée en mesurant les réponses locales et systémiques après vaccination et avant épreuve virulente des tests d'activité. Une autre estimation de l'innocuité des produits est apportée par les tests d'innocuité sur le terrain (voir ci-dessous). Les vaccins dérivés des biotechnologies doivent être évalués comme exposé dans la classification des vaccins dérivés des biotechnologies et la mise sur le marché des vaccins vivants à ADNrec comme discuté ci-dessous.

TESTS D'AUGMENTATION DE LA VIRULENCE

Avec les vaccins vivants, il existe un risque de diffusion de l'agent à partir de l'animal vacciné vers les animaux en contact et, par conséquent, il y a risque d'émergence d'une maladie chez ces animaux contaminés si l'agent a gardé une virulence résiduelle ou si une réversion vers la virulence survient. Ainsi, tous les vaccins à virus vivants doivent être testés pour la virulence à l'aide de passages en série. Les souches vaccinales sont propagées *in vivo* en les inoculant à un groupe d'animaux cibles à l'aide d'une semence primaire, généralement par la voie naturelle pour une infection et une réversion et si possible par la voie d'administration recommandée du futur vaccin produit. La souche vaccinale, isolée à partir des tissus ou des excréments, est utilisée directement pour inoculer un autre groupe d'animaux. Après au moins 5 passages (et plus pour les produits destinés aux volailles), l'isolat doit être complètement caractérisé à l'aide des mêmes procédures que celles permettant d'analyser le lot de semence primaire. L'opinion des autorités réglementaires varie quant à savoir si la propagation *in vitro* est acceptable pour les organismes qui autrement ne peuvent pas être passés 5 fois de suite en raison de leur degré d'atténuation. La souche vaccinale doit conserver un niveau acceptable d'atténuation après sa propagation selon ce protocole.

ÉVALUATION DU RISQUE POUR L'ENVIRONNEMENT

La possibilité qu'un agent vaccinal atténué ou modifié puisse diffuser chez l'animal cible ou non-cible et persister dans l'environnement doit être évaluée pour quantifier le risque qu'il représente pour l'environnement en prenant en compte les problèmes de santé publique. Dans certains cas, cette analyse sera réalisée conjointement avec les tests d'augmentation de la virulence. Ces considérations sont particulièrement importantes quand il s'agit des vaccins issus des biotechnologies ou des techniques d'ADN recombiné ; plus d'informations concernant ces produits sont développées à la fin de ce chapitre.

TESTS D'EFFICACITÉ

L'efficacité des vaccins vétérinaires doit être établie à l'aide d'essais de vaccination-épreuve validés par une analyse statistique chez l'animal hôte en utilisant les animaux les plus sensibles, en général les plus jeunes, pour lesquels le produit est recommandé. Les données expérimentales doivent montrer l'efficacité du vaccin pour chaque espèce animale cible en utilisant le protocole vaccinal décrit dans la notice, incluant les études réalisées sur l'apparition de la protection lorsque cela est mentionné sur la notice du produit ainsi que la durée de l'immunité. Les tests doivent être réalisés dans des conditions contrôlées en utilisant lorsque cela est possible des animaux séronégatifs au début de l'expérimentation. Si des tests d'efficacité validés sont disponibles, des études de vaccination-épreuve sur espèce cible peuvent ne pas être requises, si des résultats d'épreuves sérologiques prédictifs sont disponibles. L'application de procédures pour remplacer, réduire et affiner les tests sur animaux (la « loi des 3 R » : *Replace, Reduce, Refine*) doit être encouragée lorsque cela est possible.

Les études d'efficacité doivent être réalisées avec un produit vaccinal fini, obtenu à partir du niveau de passage le plus élevé du lot de semence primaire, comme cela est mentionné dans le Protocole de Production ou d'autres documentations du procédé de fabrication. Il doit spécifier la quantité minimale d'antigène par dose qui doit être incorporée dans le produit fini et être présente pendant toute la durée autorisée de validité du produit. Quand une fourchette est autorisée pour la quantité d'antigène, la quantité d'antigène par dose de vaccin utilisé dans les épreuves d'efficacité doit être inférieure ou égale à la quantité minimale requise. Le protocole de l'épreuve virulente post-vaccinale et les critères déterminant le niveau de protection varient avec l'agent pathogène cible. Ils doivent donc être normalisés dès que possible.

Les tests d'efficacité-terrain peuvent être effectués pour confirmer les résultats du laboratoire ou pour prouver l'efficacité quand des épreuves vaccination-épreuve virulentes significatives ne sont pas réalisables. Cependant, il est généralement plus difficile dans ces conditions de l'expérimentation de terrain d'obtenir des données statistiquement significatives pour démontrer l'efficacité. Les protocoles pour l'efficacité-terrain étant plus complexes, une attention particulière doit être apportée pour établir des témoins adaptés et permettre la validation de l'expérimentation. Même correctement réalisées, les études d'efficacité-terrain peuvent ne pas être significatives du fait de l'influence de facteurs externes non contrôlables. Certains de ces problèmes sont : niveau hautement variable de l'épreuve ; faible incidence de la maladie chez les témoins non vaccinés ; exposition à

d'autres agents provoquant une maladie similaire. Par conséquent, des données concernant l'efficacité obtenue à partir d'expérimentations de terrain et d'essais en animaleries peuvent être nécessaires pour démontrer l'efficacité de certains produits, ainsi que des tests de terrain *a posteriori* en relation avec la vaccinovigilance.

TESTS D'INTERFÉRENCE

Pour les produits renfermant deux composants antigéniques ou plus, des tests doivent confirmer l'absence d'interférence entre les composants individualisés. Un exemple d'interférence est donné par un composant provoquant une diminution de la réponse humorale protectrice induite par un autre composant. L'évaluation de l'interférence doit être appréciée pour chaque combinaison des fractions du produit avant la mise sur le marché.

Une perte d'efficacité peut être aussi le résultat de la présence résiduelle d'un agent inactivant dans un produit liquide inactivé que l'on utilise comme diluant d'une fraction vivante lyophilisée. L'action inactivante bactéricide ou virulicide réduit alors la viabilité de l'organisme vivant. Chaque lot/série de vaccin inactivé liquide devant être utilisé comme diluant pour un vaccin atténué doit donc être testé pour ses activités bactéricide ou virulicide résiduelles avant sa mise sur le marché.

Une attention particulière doit être également portée à la possibilité d'une interférence entre deux vaccins différents venant d'un même producteur et dont l'administration à un même animal est recommandée avec un intervalle de 2 semaines.

QUALITÉ DE LA PRODUCTION

Avant la demande de mise sur le marché d'un nouveau produit, le producteur, devra réaliser dans les conditions prévues de fabrication, 3 lots/série consécutifs du produit fini pour évaluer la qualité de la production. Les trois lots/série seront préparés en suivant le Protocole de Production et les plans et légendes des installations, les PON ou toute autre documentation portant sur le procédé de fabrication et devront, de ce fait, être « typique de la production ». Certaines autorités exigent que la taille de chacun des 3 lots/série soit égale à au moins 1/3 de la taille d'un lot commercial moyen pouvant être réalisé au cours du procédé de fabrication.

Le fabricant doit tester la pureté, l'innocuité et l'efficacité pour chacun de ces lots/série. Les méthodes suivies sont décrites dans le Protocole de Production ou toute autre documentation du procédé de fabrication. Il pourra utiliser, par exemple, les normes et procédures des tests décrites dans le CFR (Code des Réglementations Fédérales) Titre 9 section 113, dans l'Annexe de la Directive de l'UE 2001/82/CE (amendée), dans la Pharmacopée Européenne, ou dans le présent *Manuel terrestre*. Les tests doivent fournir des résultats satisfaisants pour l'ensemble des 3 lots/série avant que ne commence la production commerciale dans les conditions prévues avec mise sur le marché. Chaque lot/série suivant doit être testé de la même manière. La mise sur le marché n'intervient qu'en cas de résultats satisfaisants.

TESTS DE STABILITÉ

Les études de stabilité du produit sont fondées sur un test d'efficacité suffisante et sont requises pour établir la période de validité indiquée sur le conditionnement du produit. Certaines autorités permettent l'utilisation de tests de stabilité accélérés afin d'estimer une date provisoire de péremption (par exemple incubation pendant 1 semaine à 37 °C équivalant à une année de stabilité). De telles estimations doivent être confirmées par des tests d'efficacité réguliers effectués en temps réel sur au moins trois lots/séries différents au cours de la période de validité du produit ainsi que 3 à 6 mois après l'expiration de la date de péremption. Pour les produits contenant des organismes viables, le test doit être effectué au moment de la mise sur le marché et à la date de péremption approximative jusqu'à ce que des données statistiques fiables aient été établies. Pour les produits non viables, chaque lot/série présenté pour une licence est testé lors de la mise sur le marché puis périodiquement, ou après la date de péremption. Si à la fin de la date spécifiée (durée de vie), le produit est testé et trouvé au-dessus de la qualité attendue, une extension de la date peut être donnée après demande à l'autorité de contrôle. Les tests de stabilité procurent également l'opportunité de tester l'humidité résiduelle et d'autres paramètres importants tels que la stabilité des émulsions d'adjuvants.

MISE SUR LE MARCHÉ DES LOTS/SÉRIES

Avant la mise sur le marché, le fabricant doit tester chaque lot/série pour la pureté, l'innocuité et l'activité, et doit aussi réaliser tous les autres tests décrits dans le Protocole général de Production du fabricant ou tout autre document sur les procédures de fabrication de ce produit. Dans les pays qui possèdent des réglementations nationales qui prévoient de nouveaux contrôles sur les produits finis par les autorités officielles, des échantillons

de chaque lot/série doivent être soumis par les autorités compétentes à des tests dans des laboratoires nationaux. Si les résultats obtenus tant par le fabricant que par les autorités compétentes ne sont pas satisfaisants, le lot/série ne devra pas être mis sur le marché. Dans de telles situations, les lots/séries suivants devront être testés en priorité par les autorités compétentes.

1. Tests de pureté sur les lots/séries

La pureté est déterminée en recherchant la présence de différents contaminants. Les tests pour détecter les contaminants sont réalisés sur : les lots primaires de semence, les Banques Primaires de Cellules, les matières premières d'origine animale ne pouvant pas être stérilisées (par exemple le sérum fœtal bovin, l'albumine bovine ou la trypsine) et chaque lot/série du produit fini avant sa mise sur le marché.

Les procédures des tests de pureté sont décrites dans le CFR Titre 9 section 113, dans l'annexe de la Directive de l'UE 2001/82/CE (amendée), dans la Pharmacopée Européenne ou dans le présent *Manuel terrestre*. Elles permettent la détection : de virus, de bactéries, de mycoplasmes et de champignons étrangers viables, comme par exemple les *Salmonella*, *Brucella*, agents chlamydiens, virus hémagglutinants, virus de la leucose lymphoïde, les agents pathogènes mis en évidence par un test d'inoculation au poulet, les agents pathogènes détectés par un test d'inoculation à des œufs embryonnés, l'agent de la chorioméningite lymphocytaire, les agents hémadsorbants générant un effet cytopathogène, les agents étrangers détectés par des techniques immuno-enzymatique (ELISA), par des réactions d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), ou par immunofluorescence indirecte. Les procédures utilisées pour certifier que le sérum de veau fœtal et les autres matières premières d'origine bovine sont exempts de pestivirus doivent être hautement considérées et bien documentées. Les tests devant être utilisés pour vérifier la pureté dépendent de la nature du produit biologique et doivent être mentionnés dans la monographie du produit ou toute autre documentation du procédé de fabrication. Puisque les tests pour la détection des agents responsables des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) dans les matières premières d'origine animale n'ont pas été développés, les fabricants de vaccins doivent indiquer dans les Protocoles généraux de Production, les mesures qu'ils mettent en œuvre pour minimiser le risque d'une telle contamination dans les matières premières d'origine animale. Ces mesures reposent sur trois principes : i) la vérification que toutes ces matières premières dans les établissements de production proviennent bien de pays reconnus comme présentant le risque le plus bas possible d'infection par l'encéphalopathie spongiforme bovine, ii) la vérification que les tissus (et autres substances) utilisés sont eux-mêmes réputés présenter un risque nul ou faible d'être infectés par des agents des EST, iii) quand cela est pertinent, que les procédés d'inactivation des agents des EST employés ont bien été validés. Les méthodes de production doivent également refléter les mesures prises pour prévenir des contaminations croisées de matériels à faible risque par du matériel à plus haut risque durant le processus de fabrication.

2. Test d'innocuité sur les lots/séries

Les tests d'innocuité réalisés en vue de la mise sur le marché d'un lot sont décrits dans le CFR Titre 9 section 113, dans la Pharmacopée Européenne, dans ce *Manuel terrestre* et également dans d'autres publications officielles. Des procédures normalisées pour les tests d'innocuité en général sont décrites pour la souris, le cobaye, le chat, le chien, le porc et le mouton. Elles nécessitent généralement moins d'animaux que les tests d'innocuité réalisés pour la demande d'AMM. Le lot/série est considéré satisfaisant si les réactions locales et systémiques suite à la vaccination correspondent à celles décrites dans le dossier de demande d'AMM et la littérature scientifique. Certaines autorités n'acceptent pas les tests d'innocuité sur animaux de laboratoire et exigent un test sur une des espèces-cibles visées par le produit.

3. Tests d'activité sur les lots/séries

Les tests d'activité requis pour chaque lot/série avant la mise sur le marché sont prévus pour être corrélés avec les études d'efficacité réalisées sur l'animal-cible à l'aide d'un test vaccination-épreuve virulente. Pour les produits viraux et bactériens inactivés, les tests d'activité peuvent être réalisés au laboratoire ou chez l'animal hôte ou encore à l'aide de méthodes quantitatives *in vitro* validées pour leur corrélation avec les tests d'activité *in vivo*. L'activité des vaccins vivants est généralement mesurée par un titrage viral ou un dénombrement bactérien. Les vaccins recombinés ou issus des biotechnologies doivent aussi être testés. Les organismes génétiquement modifiés vivants peuvent être quantifiés par titrage comme n'importe quel autre vaccin vivant, tandis que les produits d'expression issus des technologies de recombinaison sont quantifiés par des tests *in vitro*. Ceux-ci peuvent se révéler plus faciles à réaliser que les tests avec les antigènes naturels en raison de la purification du produit au cours de la fabrication.

Lorsqu'un vaccin à bactéries vivantes est testé en vue de sa mise sur le marché, le dénombrement bactérien doit être supérieur à la dose minimale du lot de semence primaire capable d'induire une protection (test d'immunogénicité ou efficacité) ; cette quantité minimale doit être présente à tout moment jusqu'à la date de péremption, le dénombrement bactérien étant égal au moins à la quantité utilisée au cours du test d'immunogénicité. Lorsqu'un vaccin à virus vivant est testé en vue de sa mise sur le marché, le titre viral doit être

supérieur à la dose minimale du lot de semence primaire capable d'induire une protection (test d'immunogénicité ou efficacité) ; cette quantité minimale doit être présente à tout moment jusqu'à la date de péremption, le titre viral étant égal au moins à la quantité utilisée au cours du test d'immunogénicité. Certaines autorités de contrôle fixent des doses minimales bactériennes ou virales plus élevées que cela. Il est évident le titre approprié dépend dans un premier temps de l'activité requise et secondairement du taux persistant de bactéries ou de virus dans le vaccin, comme cela est indiqué par le test de stabilité.

Les exigences requises pour une mise sur le marché sont toujours décrites et publiées par les autorités nationales compétentes en matière d'évaluation de l'efficacité de plusieurs vaccins. Ces tests peuvent être trouvés dans le CFR Titre 9 section 113, dans la Pharmacopée Européenne, et dans ce *Manuel terrestre*.

AUTRES TESTS

Certains tests peuvent être indiqués et doivent être réalisés comme il est mentionné dans la Monographie ou tout autre document sur le procédé de fabrication en fonction de la forme du vaccin fabriqué. Ces tests peuvent concerner : le degré d'humidité contenue dans les produits lyophilisés, la quantité d'inactivant résiduel des produits tués, l'inactivation complète des produits tués, le pH, la quantité de conservateurs et d'antibiotiques autorisés, la stabilité physique des adjuvants, le vide résiduel dans les produits lyophilisés et l'examen physique général du vaccin fini. Les tests pour ces différents paramètres sont également trouvés dans le CFR Titre 9 section 113, dans la Directive de l'Union Européenne 2001/82/CE, dans la Pharmacopée Européenne ou dans le présent *Manuel terrestre*.

ÉCHANTILLONNAGE

Les échantillons doivent être sélectionnés pour chaque lot/série du produit. Le nombre d'échantillons devra être représentatif de la quantité finale de flacons dans chaque lot/série. Ils seront conservés à la température recommandée sur l'étiquette. Le responsable de fabrication devra conserver ces échantillons au moins 6 mois après la date d'expiration à la température recommandée sur l'étiquette ; dans ces conditions, les échantillons sont toujours disponibles pour résoudre les origines de problèmes survenus sur le terrain lors de l'utilisation du vaccin. Les échantillons doivent être conservés dans une réserve sécurisée et avoir une ouverture non falsifiable.

ÉTIQUETAGE

Les normes d'étiquetage varient d'un pays à un autre. Cependant, les indications et plus généralement tout ce qui est écrit sur l'étiquette doit être corrélé à des données appropriées qui ont été vérifiées et expertisées par l'autorité compétente. Il est recommandé que toutes les étiquettes pour les vaccins vétérinaires soient résistantes à l'eau et contiennent au moins les informations ci-dessous. Toutefois, pour les récipients vraiment petits, l'étiquette peut faire référence à l'étiquette du carton d'emballage ou à une fiche jointe dans l'emballage pour les quelques informations de moindre importance :

1. Le nom véritable du produit, en lettres proéminentes identiques pour tous ses mots ;
2. Le nom et l'adresse du producteur (et aussi de l'importateur pour les produits importés) ;
3. La température recommandée de conservation ;
4. Une déclaration précisant que le produit est « seulement à usage vétérinaire (ou pour les animaux) ». Les instructions complètes d'utilisation en incluant toutes les précautions d'usage ;
5. Pour les produits animaux utilisés dans l'alimentation, un règlement devra indiquer que les animaux producteurs ne doivent pas être vaccinés au cours d'un nombre spécifié de jours précédant l'abattage (cela dépend du vaccin et du type d'adjuvant, et n'est pas requis pour tous les produits) ;
6. La date d'expiration ;
7. Le numéro du lot/série qui permet d'identifier le produit au niveau des registres du producteur ;
8. Le numéro d'AMM pour le produit. Dans certains pays, il est remplacé par le numéro d'enregistrement de l'établissement ou du fabricant ;
9. La quantité et le nombre de doses disponibles dans le flacon ;

10. Une recommandation devra indiquer que le contenu total d'un flacon multi-doses doit être utilisé entièrement après que le flacon a été entamé pour la première fois (ou indiquer dans quel laps de temps, en accord avec les données du fabricant) et que tout reste inutilisé du produit doit être éliminé selon des règles appropriées ;
11. Les mesures de précautions pour l'utilisateur seront indiquées si nécessaire (par exemple le risque encouru lors d'injections accidentelle avec des vaccins avec adjuvant huileux) ;
12. Lorsque l'adjonction d'un antibiotique à un vaccin pendant le procédé de production est autorisée, la déclaration « Contient (nom de l'antibiotique) comme conservateur » ou une déclaration équivalente indiquant l'antibiotique ajouté doit apparaître sur le carton ou les emballages (s'il y en a). S'il n'y a pas de cartons, ces informations devront être mentionnées sur l'étiquette de l'emballage final.

Les étiquettes peuvent également mentionner d'autres indications qui ne doivent pas être fausses ou trompeuses. Les restrictions spéciales concernant l'utilisation ou la manipulation du produit doivent être indiquées quand cela est nécessaire.

Des informations similaires doivent également être données sur une fiche technique du produit, insérée dans l'emballage (Instructions d'utilisation). Cette fiche contient plus de détails sur la méthode d'utilisation du produit et les réactions indésirables possibles.

TESTS DE TERRAIN (INNOCUITÉ ET EFFICACITÉ)

Tous les produits biologiques vétérinaires administrés aux animaux doivent être testés pour leur innocuité et, si possible, leur efficacité sur le terrain, en utilisant les Bonnes Pratiques Cliniques (BPC), avant leur autorisation d'utilisation à grande échelle. Les études de terrain servent à démontrer l'efficacité dans des conditions habituelles et à détecter toute réaction inattendue, y compris la mortalité, qui n'aurait pas été observée au cours du développement du produit. Il existe de multiples variables incontrôlables dans les conditions de terrain qui rendent difficile la collecte de données correctes, mais la démonstration de l'innocuité est plus fiable. Les tests doivent être réalisés sur l'animal hôte, dans divers lieux géographiques, à l'aide d'un nombre approprié d'animaux sensibles. Les animaux testés doivent représenter tous les âges et les différentes pratiques d'élevage pour lesquels le produit est indiqué ; des témoins non vaccinés doivent être inclus. Le produit testé doit provenir d'un ou plusieurs lots/série de production. Un protocole doit être développé en indiquant les méthodes d'observation et d'enregistrement des données.

INSPECTION DES INSTALLATIONS DE PRODUCTION

Les établissements agréés pour la fabrication de produits biologiques vétérinaires doivent subir une inspection détaillée de l'ensemble de leurs locaux par l'autorité nationale compétente. Il est procédé à la vérification de la conformité des installations avec les déclarations décrites dans le Protocole de production, les plans et légendes mentionnés, les PON et tout autre documentation portant sur le procédé de fabrication. Ces inspections peuvent inclure différents aspects comme : les qualifications du personnel ; les registres ; les normes de laboratoire et installations sanitaires ; les activités de recherche sur les produits en cours de développement ; les procédures de production ; les opérations de stérilisation, pasteurisation, incubation et réfrigération ; les opérations de remplissage, de lyophilisation et les procédures finales ; l'entretien et la surveillance des animaux ; les procédures des tests ; la distribution et la commercialisation ; les méthodes de destruction. Il est conseillé de suivre les BPF, ou Bonnes Pratiques de Fabrication (pour le fabricant) et les BPL, Bonnes Pratiques de Laboratoire (pour les tests de l'assurance qualité et des contrôles de qualité) (se reporter au Chapitre 1.1.3., « Gestion de la qualité dans les laboratoires de diagnostic vétérinaire » pour les lignes directrices).

Les inspecteurs doivent préparer un rapport intelligible décrivant les résultats de l'inspection et définissant les actions à mettre en œuvre par le fabricant pour améliorer le processus de fabrication. L'établissement doit recevoir une copie de ce rapport. Une seconde inspection peut être nécessaire pour vérifier que des actions correctives appropriées ont été mises en place. Une évaluation permanente est nécessaire pour s'assurer que les installations satisfont les nécessités de la production.

ACTUALISATION DU PROTOCOLE DE FABRICATION

Avant de changer les PON en production, il faut modifier le Protocole de Fabrication ou tout autre document équivalent. Les établissements doivent avoir des procédures internes d'évaluation pour mesurer tout changement dans la production avant qu'il ne soit initié. Les changements doivent aussi être évalués et approuvés par l'autorité compétente avant leur application. Si une étape importante de la production est modifiée, les révisions peuvent imposer la fourniture de données additionnelles pour garantir la pureté, l'innocuité et/ou l'efficacité du

produit. Dans les pays ayant des réglementations incluant le contrôle du produit fini dans un laboratoire national, toute révision doit impliquer le contrôle du nouveau produit par les autorités compétentes.

SURVEILLANCE DES PERFORMANCES DU PRODUIT

Il est exigé des fabricants de mettre en place un système de notification des réactions indésirables ainsi qu'un mécanisme efficace pour le rappel rapide des produits. Ceux-ci seront soumis à des procédures d'audit par les corps d'inspection officiels. Dans de nombreux pays, le fabricant doit notifier sans délai toute réaction anormale aux autorités de contrôle ainsi que toute mesure corrective effectuée. Une autre solution utilisée dans certains pays, consiste à ce que le fabricant avertisse immédiatement les corps d'inspection à chaque fois qu'il découvre des indications soulevant des interrogations sur la pureté, la capacité d'innocuité, ou l'efficacité d'un produit, ou s'il est apparu un problème de préparation du produit, ou un problème dans un test ou dans la distribution du produit, et décrive les circonstances d'apparition des anomalies et les mesures correctives effectuées.

Après la mise sur le marché du produit, les performances doivent être suivies sur le terrain par les autorités compétentes. Les plaintes des utilisateurs doivent être suivies d'une enquête pour déterminer si les observations rapportées sont attribuables ou non à l'utilisation du produit. Les utilisateurs de vaccins vétérinaires doivent être informés des procédures pour envoyer leur plainte. Le fabricant du produit doit être informé de toute plainte reçue par les autorités compétentes. Celles-ci doivent vérifier également si des plaintes semblables ont été enregistrées pour le même produit ; et dans l'affirmative, elles vérifieront si le fabricant a pris les mesures de correction nécessaires. Les laboratoires de contrôle peuvent analyser des échantillons du lot/série du produit incriminé si cela est nécessaire.

A l'issue de l'enquête, un rapport final doit être préparé et un résumé des résultats obtenus est envoyé au plaignant et au fabricant. S'il est prouvé qu'un produit est à l'origine de problèmes graves, une action rapide doit être mise en œuvre pour retirer le produit du marché et pour notifier l'information aux autorités en charge de la santé animale.

MISE EN APPLICATION

Une autorité légale doit être conférée aux programmes nationaux établis pour garantir la pureté, l'innocuité, l'activité et l'efficacité des vaccins vétérinaires afin d'assurer leur conformité avec les conditions d'enregistrement des produits vétérinaires et certaines exigences des programmes mêmes. L'objectif est d'obtenir des fabricants une mise en conformité volontaire de leurs produits avec les exigences réglementaires promulguées. Cependant, lors de violation de ces exigences réglementaires, l'autorité compétente doit avoir recours à des mesures permettant de protéger les santés animale et humaine. Il apparaît nécessaire que l'autorité puisse consigner saisir et détruire les produits trouvés inactifs, contaminés, dangereux ou nocifs. Le produit peut être consigné par cette autorité pendant une certaine durée ; si au cours de cette période aucune garantie sur la qualité du produit n'est obtenue, l'autorité compétente peut demander un ordre de justice ou un arrêt de saisie et une condamnation.

Il doit exister dans chaque pays une autorité pour retirer ou suspendre les AMM et/ou l'autorisation de fabrication, mettre en demeure, et arrêter la commercialisation d'un produit. Des pénalités civiles ou des poursuites pénales peuvent être nécessaires pour faire cesser des violations délibérées et graves.

AUTORISATION DES PRODUITS ISSUS DES BIOTECHNOLOGIES

Les avancées récentes en biotechnologie ont permis le développement et la commercialisation de nouveaux produits biologiques ayant des propriétés antigéniques et diagnostiques utiles. Nombre de ces produits ont déjà reçu une AMM ou ont été approuvés. Un nombre encore plus grand est en cours de développement. Les produits issus de l'ADNrec ne diffèrent pas fondamentalement des produits conventionnels. Les législations et règlements existants sont ainsi totalement applicables pour ces nouveaux produits.

CLASSIFICATION DES VACCINS DÉRIVÉS DES BIOTECHNOLOGIES

Chaque autorité compétente ayant le pouvoir de réglementer les micro-organismes et les produits dérivés du génie génétique doit vérifier que la santé publique et l'environnement sont protégés de tout effet nocif. Afin d'évaluer les demandes d'AMM, les vaccins vétérinaires dérivant des biotechnologies peuvent être classés en 3 catégories. Cette classification est fondée sur les propriétés biologiques du produit et les risques qu'il présente en matière d'innocuité.

Catégorie I : elle est constituée de produits tués ou non viables qui n'entraînent aucun risque pour l'environnement et ne présente aucun danger nouveau ou inhabituel en matière de biosécurité. De tels agents comprennent les micro-organismes inactivés, entiers ou à l'état de sous-unités, obtenus en utilisant les techniques de l'ADN recombiné.

Catégorie II : elle est constituée de micro-organismes vivants ou modifiés par addition ou délétion d'un ou plusieurs gènes. L'addition de gènes peut coder pour des marqueurs antigéniques, des enzymes, ou des dérivés biochimiques. Les gènes supprimés peuvent être impliqués dans la virulence, l'oncogénicité, ou coder pour des antigènes marqueurs, des enzymes, ou d'autres dérivés biochimiques. La demande d'une AMM doit inclure une caractérisation des fragments d'ADN ajoutés ou supprimés ainsi qu'une caractérisation du phénotype de l'organisme altéré. Les modifications génétiques ne doivent pas aboutir à un accroissement de la virulence, de la pathogénicité ou de la viabilité de l'organisme modifié par rapport à sa forme sauvage. Il est important que les modifications génétiques n'altèrent pas les facteurs de sécurité de l'organisme.

Catégorie III : elle est constituée de produits réalisés à partir de vecteurs vivants pour porter des gènes recombinés codant pour des antigènes immunogènes. Les vecteurs vivants peuvent porter un ou plusieurs gènes étrangers qui sont efficaces pour induire une immunité chez l'espèce cible. L'utilisation des vaccins à ADN contenant des gènes recombinés codant pour des antigènes immunogènes (vaccins à ADN plasmidique) constitue une nouvelle approche au développement de vaccins. Une catégorisation convenable de ce type de produit dérivé d'ADN recombiné ne pourra être établie que lorsque les propriétés biologiques et les caractéristiques d'innocuité seront déterminées. Ces nouveaux vaccins peuvent trouver des applications dans une large variété de situations, plus que pour les produits conventionnels. Les directives pour le développement, la production, la caractérisation et le contrôle de ces nouveaux produits restent préliminaires et soumises à des changements en fonction des nouvelles données et de l'avancement des connaissances. Des informations concernant l'état actuel des réflexions sur les directives réglementaires des vaccins à ADN plasmidique sont accessibles sur internet aux adresses suivantes :

<http://www.cba.univie.it/VL/bio-info.html> ; http://www.orcbs.msu.edu/biological/bio_toxsaft.htm ;
<http://www.pestlaw.com/index.html> ; <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/iwp/000798en.pdf>.

MISE SUR LE MARCHÉ DE PRODUITS DÉRIVÉS DE L'ADNrec

La mise sur le marché ou l'expérimentation terrain de microorganismes vivants dérivant de la technologie de l'ADN recombiné et de vaccins à ADN plasmidique (catégories II et III) peut entraîner des effets significatifs sur la qualité de l'environnement et la santé humaine et animale. Avant toute AMM, le fabricant de vaccin doit réaliser une étude d'évaluation des risques en matière d'impact sur l'environnement et la santé humaine et animale. Par exemple, aux USA, une procédure est adoptée et peut être utilisée comme modèle dans d'autres pays. L'Union Européenne a adopté un système similaire. Cette procédure est la suivante :

Une évaluation du risque doit contenir les informations suivantes : la raison et la nécessité de la demande ; les alternatives considérées ; une liste d'agences gouvernementales, d'organisations, et de personnes consultées ; l'environnement atteint et les conséquences potentielles pour cet environnement. Les thèmes discutés doivent comprendre : les caractéristiques de l'organisme vaccinal, les risques pour la santé humaine, les risques pour la santé animale pour les espèces cibles et non-cibles, la persistance dans l'environnement et l'augmentation de la virulence.

Si l'évaluation du risque, en accord avec l'autorité compétente, montre que l'utilisation du vaccin recombiné dans l'environnement au cours d'essais terrain ou lors d'une utilisation plus générale n'a pas d'impact significatif sur l'environnement, une information doit être écrite et distribuée au public. Elle indique que l'évaluation des risques et les résultats des analyses sont disponibles pour le public et soumis à commentaire. Si aucun commentaire n'est enregistré pour réfuter les résultats, l'autorité compétente peut autoriser l'essai-terrain ou accorder l'AMM ou donner un accord pour un essai élargi.

La préparation de l'évaluation des risques et les résultats enregistrés peuvent inclure un programme d'information publique sous forme d'une ou plusieurs réunions publiques, si le produit a un impact écologique ou une importance en santé publique. De telles réunions doivent être préparées et annoncées par écrit au public. Les personnes intéressées doivent être invitées pour faire des présentations avec le fabricant du produit et les personnes compétentes de l'autorité gouvernementale. Les comptes-rendus de ces réunions doivent devenir une partie des documents publics.

Si, pendant la période dédiée à l'évaluation du risque, les autorités compétentes concluent que le produit proposé peut avoir une action significative sur l'environnement ou la santé humaine, une Déclaration d'Impact sur l'Environnement ou Milieu Ambiant (EIS pour *Environmental Impact Statement*) doit être préparé. Cette Déclaration fournit une discussion claire et impartiale des impacts significatifs environnementaux et informe les décideurs et le public de toutes solutions raisonnables de remplacement qui éviteraient ou minimiseraient des effets néfastes. (Les documents sur l'environnement sont pris en compte dans le CFR Titre 40 section 1508). Lire

également la Directive de l'Union Européenne 2001/18/CE et se reporter sur le site de l'EMA à l'adresse suivante : <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/iwp/000404en.pdf>.

AUTRES LECTURES

Les références suivantes sont des textes conseillés qui comprennent des guides sur la production des vaccins.

- A. COUNCIL OF EUROPE (2005). European Pharmacopoeia, Fifth Edition. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France.
- B. ESPESETH D.A. (1993). Licensing Veterinary Biologics in the United States. The First Steps Towards an International Harmonization of Veterinary Biologics; and Free circulation of vaccines within the EEC. *Dev. Biol. Stand.*, **79**, 17–25.
- C. ESPESETH D.A. & GOODMAN J.B. (1993). Chapter 13. *In*: Licensing and Regulation in the USA. Vaccines for Veterinary Application. Butterworth Heinemann, London, UK, 321–342.
- D. EUROPEAN COMMISSION (2006). The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Eudralex. Volumes 1–9. European Commission Enterprise and Industry DG; Directorate F – Consumer goods. Latest versions only available at <http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/index.htm>.
- E. GAY C.G. & ROTH H.J. (1994). Confirming the safety characteristics of recombinant vectors used in veterinary medicine: a regulatory perspective. Recombinant vectors in vaccine development. *Dev. Biol. Stand.*, **82**, 93–105.
- F. ROTH H.J. & GAY C.G. (1996). Specific safety requirements for products derived from biotechnology. *In*: Veterinary Vaccinology, Pastoret P.-P., Blancou J., Vannier P. & Verschueren C., eds. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, The Netherlands.
- G. PASTORET P.-P., BLANCOU J., VANNIER P. & VERSCHUEREN C., EDS (1997). Veterinary Vaccinology. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- H. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2000). Code of Federal Regulations, Title 9, Parts 1-199. US Government Printing Office, Washington DC, USA.
- I. USDA-APHIS¹-VETERINARY SERVICES-CENTER FOR VETERINARY BIOLOGICS (1999). Categories of Inspection for Licensed Veterinary Biologics Establishments. Veterinary Services Memorandum No. 800.91. Center for Veterinary Biologics, 510 S. 17th Street, Suite 104, Ames, Iowa 50010, USA.
- J. USDA-APHIS-VETERINARY SERVICES-CENTER FOR VETERINARY BIOLOGICS (1999). Veterinary Biological Product Samples. Veterinary Services Memorandum No. 800.59. Center for Veterinary Biologics, 510 S. 17th Street, Suite 104, Ames, Iowa 50010, USA.
- K. USDA-APHIS- VETERINARY SERVICES-CENTER FOR VETERINARY BIOLOGICS (1995). Guidelines for Submission of Materials in Support of Licensure. Veterinary Biologics Memorandum No. 800.84. Center for Veterinary Biologics, 510 S. 17th Street, Suite 104, Ames, Iowa 50010, USA.
- L. USDA-APHIS-VETERINARY SERVICES-CENTER FOR VETERINARY BIOLOGICS (1995). Veterinary Biologics General Licensing Considerations No. 800.200, Efficacy Studies. USDA-APHIS-Veterinary Biologics, 4700 River Road, Riverdale, Maryland 20737, USA.
- M. USDA-APHIS-VETERINARY SERVICES-CENTER FOR VETERINARY BIOLOGICS (1995). Veterinary Biologics General Licensing Considerations No. 800.201, Back Passage Studies. Center for Veterinary Biologics, 510 S. 17th Street, Suite 104, Ames, Iowa 50010, USA.
- N. USDA-APHIS-VETERINARY SERVICES (1964–1994). Standard Assay Methods, Series 100–900. National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa 50010, USA.

1 United States Department of Agriculture (USDA), Animal and Plant Health Inspection Services (APHIS). L'adresse de la page d'accueil du site internet de l'USDA-APHIS-Center for Veterinary Biologics est la suivante : <http://www.aphis.usda.gov/vs/cvb/index.html>.

- O. USDA-APHIS- VETERINARY SERVICES-CENTER FOR VETERINARY BIOLOGICS (1984). Basic License Requirements for Applicants. Veterinary Biologics Memorandum No. 800.50. Center for Veterinary Biologics, 510 S. 17th Street, Suite 104, Ames, Iowa 50010, USA
- P. USDA-APHIS-VETERINARY SERVICES-CENTER FOR VETERINARY BIOLOGICS (1988). Guidelines for the Preparation and Review of Labeling Materials. Veterinary Services Memorandum No. 800.54. Center for Veterinary Biologics, 510 S. 17th Street, Suite 104, Ames, Iowa 50010, USA.

*
* *

ANNEXE 1.1.8.1.

ANALYSE DE RISQUE RELATIVE AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE VÉTÉRINAIRE

GÉNÉRALITÉS

Tous les produits d'origine animale, y compris les produits biologiques à usage vétérinaire, ont la capacité de transmettre des maladies animales. Cette capacité dépend de la nature même des produits, de leur origine, des traitements qu'ils ont subis et de l'usage auquel ils sont destinés. En particulier, pour les produits biologiques à employer in vivo, la probabilité d'exposition à des animaux est la plus élevée, de sorte que le risque encouru est maximal. Les produits à employer in vitro peuvent introduire des maladies dans des populations animales s'ils sont utilisés in vivo délibérément ou par inadvertance, s'ils contaminent d'autres produits biologiques ou s'ils sont disséminés d'une autre manière. Même les produits destinés au diagnostic et à la recherche risquent d'entrer en contact direct avec des animaux. Les micro-organismes exotiques, dont certains sont hautement pathogènes, peuvent être conservés à des fins de diagnostic et de recherche dans des pays indemnes d'infection ou des maladies qu'ils provoquent, et risquer de contaminer d'autres produits biologiques.

Les Autorités vétérinaires des pays importateurs doivent faire connaître les procédures particulières qu'elles imposent pour l'autorisation de mise sur le marché des produits biologiques à usage vétérinaire. Elles peuvent restreindre la livraison des produits à des établissements agréés, ou en limiter l'emploi à des manipulations in vitro ou à des usages non vétérinaires, lorsqu'une telle garantie ne peut être fournie.

*

* *

ANNEXE 1.1.8.2.

ANALYSE DE RISQUE RELATIVE AUX VACCINS VÉTÉRINAIRES

INTRODUCTION

L'analyse de risque relative aux vaccins vétérinaires doit se fonder sur les principes de l'assurance qualité, qui comprend le contrôle de la qualité, dans leur production. Ces recommandations portent essentiellement sur les risques liés à la contamination des vaccins par des agents infectieux, et notamment sur le risque d'importation de maladies exotiques. Le risque majeur d'introduction d'une maladie dans un pays est constitué par l'importation d'animaux vivants ou de produits d'origine animale et, plus rarement, par des vaccins à usage vétérinaire. Ces vaccins peuvent, néanmoins, être contaminés par des agents pathogènes si les lots de semence, les souches, les cultures cellulaires, les animaux ou les ingrédients d'origine animale, tels que le sérum de fœtus de veau, utilisés en cours de production sont contaminés ou si une contamination croisée survient dans le processus de production.

PRINCIPES

Les pays exportateurs et les pays importateurs doivent convenir d'un système de classification des risques liés aux vaccins vétérinaires qui tienne compte de facteurs tels que les procédures de purification utilisées.

Les pays exportateurs et les pays importateurs doivent convenir de modèles d'analyse des risques portant sur des processus et des produits spécifiques. Ces modèles doivent inclure une appréciation scientifique des risques et des procédures types pour émettre des recommandations sur la gestion et la communication des risques. La réglementation des vaccins vétérinaires doit prescrire l'utilisation de modèles qualitatifs ou quantitatifs.

L'analyse de risque doit être aussi objective et transparente que possible. Les méthodes d'analyse par étapes et à arbre de scénario doivent être utilisées pour l'appréciation des risques, chaque fois que nécessaire, étant donné qu'elles permettent de repérer les points critiques en cours de fabrication et d'utilisation des produits où apparaissent les risques et qu'elles contribuent à les caractériser.

Les mêmes conclusions de l'analyse de risque peuvent être obtenues avec des méthodes différentes. Lorsque les méthodes diffèrent d'un pays à l'autre, il convient de recourir, autant que possible, au concept d'équivalence ; ces méthodes doivent être validées de façon à s'assurer qu'elles ont une sensibilité comparable.

CONDITIONS DE FABRICATION

La fabrication de vaccins vétérinaires revêt des caractéristiques particulières qui doivent être prises en considération lors de la mise en œuvre et de l'évaluation d'un système d'assurance qualité. Compte tenu du grand nombre d'espèces animales existantes et des agents pathogènes qui leur sont liés, la diversité des produits est particulièrement grande, alors que les volumes de fabrication sont souvent faibles ; on travaille donc le plus souvent par groupes de produits. De plus, en raison de la nature même de cette fabrication (phases de culture, absence de stérilisation terminale, etc.), les produits doivent être particulièrement bien protégés contre la contamination et la contamination croisée. L'environnement doit également être protégé, surtout lorsque la fabrication implique l'usage d'agents pathogènes ou d'agents biologiques exotiques. Il en va de même du personnel, qui doit bénéficier d'une excellente protection lorsque des agents biologiques pathogènes pour l'homme servent à cette fabrication.

Compte tenu de ces facteurs et de la variabilité inhérente aux produits immunologiques, le système d'assurance qualité joue un rôle de la plus haute importance. Il faut notamment que les vaccins soient fabriqués conformément à un système codifié et reconnu, comprenant des spécifications relatives au matériel, aux locaux, à la qualification du personnel, ainsi qu'à l'assurance qualité et aux inspections qui doivent être conduites régulièrement.

Un système, agréé par toutes les parties concernées, de contrôle des installations par des inspecteurs qualifiés et spécialisés doit être mis en place pour garantir la confiance.

INFORMATION À FOURNIR LORS DE LA DEMANDE D'AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHÉ DANS LE PAYS IMPORTATEUR

Le fabricant ou l'Autorité vétérinaire du pays exportateur doit communiquer au pays importateur la pharmacopée qu'il ou elle utilise. Le pays importateur doit disposer de documents donnant des précisions sur les méthodes de contrôle de qualité utilisées et l'origine de chaque lot de matières premières. Les principales étapes du processus de fabrication des vaccins vétérinaires doivent être décrites en détail pour faciliter l'analyse de risque. L'analyse de risque doit se concentrer sur les parties du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché relatives à la qualité et à l'innocuité. Les tests d'innocuité en laboratoire doivent porter sur des espèces cibles et non cibles afin d'obtenir suffisamment de données biologiques. Toutes les procédures de contrôle utilisées doivent correspondre à l'état des connaissances scientifiques au moment de leur emploi, et être validées.

Dans la présentation de la méthode d'élaboration du produit fini doivent figurer une caractérisation adéquate des substances nécessaires à la préparation des lots de semence de travail, la description des traitements appliqués aux matières premières en vue d'éviter une contamination, et un relevé des différentes étapes de la fabrication donnant lieu à des contrôles en cours de fabrication.

Les résultats des contrôles effectués en cours de fabrication et sur le produit fini, ainsi que leur sensibilité, doivent être pris en compte dans l'analyse de risque. La description étape par étape des procédures de contrôle doit également être disponible.

CLASSIFICATION DES VACCINS VÉTÉRINAIRES

Pour les besoins de l'analyse de risque, les pays doivent établir un système de classification des vaccins vétérinaires fondé sur divers critères, tels que les agents pathogènes utilisés comme principe actif, leurs caractéristiques propres et le risque qu'ils présentent.

S'il s'agit de vaccins à vecteur vivant, l'innocuité du vecteur pour les espèces cibles et non cibles et pour l'homme doit être évaluée. Une attention particulière doit être accordée aux éventuelles modifications pouvant intervenir dans le tropisme tissulaire ou bien la sensibilité des organismes hôtes du recombinant.

VACCINOVIGILANCE

Les pays exportateurs et les pays importateurs doivent s'assurer qu'un système fiable de vaccinovigilance (suivi après autorisation de mise sur le marché) a été mis en place pour identifier précocement tout problème grave rencontré lors de l'utilisation de vaccins vétérinaires. La vaccinovigilance doit être continue et faire partie intégrante de toutes les réglementations applicables aux vaccins vétérinaires, notamment aux vaccins à vecteur vivant.

COMMUNICATION DU RISQUE

Le fabricant ou l'Autorité vétérinaire du pays exportateur doit fournir une information fiable à l'appui des demandes d'autorisation de mise sur le marché faites dans les pays importateurs. Les Autorités vétérinaires doivent s'échanger en permanence les données pertinentes concernant l'analyse de risque, les changements intervenus dans la situation zoonositaire et la vaccinovigilance.

*
* *

CONTRÔLE DE LA STÉRILITÉ OU DE L'ABSENCE DE CONTAMINATION DES MATÉRIELS BIOLOGIQUES

INTRODUCTION

La stérilité est définie par l'absence d'organismes vivants. Elle est réalisée par chauffage, filtration, traitement aux rayons ionisants ou par l'oxyde d'éthylène, et par l'application ultérieure de tout procédé d'asepsie. L'absence de contamination est définie comme l'absence d'organismes spécifiés vivants. Cet état est généralement obtenu en choisissant un matériel provenant d'une source indemne d'organismes spécifiés et en réalisant des procédures ultérieures aseptiquement. Une garantie suffisante de la stérilité et de l'absence de contamination ne peut être obtenue que par un contrôle adapté des produits primaires utilisés et de leur condition de transformation et de stockage. Des tests sur le produit sont nécessaires pour vérifier que le contrôle a été réalisé de façon adéquate.

A. PROCÉDURES GÉNÉRALES

1. Les matières premières doivent être collectées à partir de sources indemnes de contamination ; les manipulations des produits devront minimiser les contaminations et réduire les chances de multiplication des micro-organismes.
2. Les matières premières qui peuvent être stérilisées sans perte de leurs activités biologiques doivent être stérilisées par une méthode efficace appropriée. Le procédé doit réduire le niveau de contamination à un niveau inférieur au seuil de détection, défini selon un test de stérilité approprié (voir paragraphe B.3 ci-dessous).
3. Si un procédé de stérilisation est utilisé, il doit être validé pour démontrer son adéquation et contrôlé de façon optimale pour prouver à chaque fois le bon fonctionnement du procédé.
4. Les matières premières qui ne sont pas stérilisées et celles qui doivent être transformées après un procédé de stérilisation doivent être manipulées aseptiquement.
5. L'environnement dans lequel les manipulations aseptiques sont opérées doit être maintenu propre et protégé des sources de contamination extérieures ; un contrôle régulier doit être effectué afin de prévenir les contaminations internes.

B. VACCINS À VIRUS NON INACTIVÉS ADMINISTRÉS PAR INJECTION

1. Les produits biologiques d'origine animale (a) doivent être stérilisés, ou (b) doivent dériver d'animaux en bonne santé, indemnes d'organismes pathogènes transmissibles de l'espèce d'origine aux espèces vaccinées ou de toutes espèces en contact avec eux, ou (c) l'absence de tels agents pathogènes doit être prouvée à partir du matériel initial.
2. Les lots de semence virales et les lignées cellulaires continues utilisées pour la croissance virale doivent être indemnes de bactéries, champignons, mycoplasmes, virus étrangers, et de tout autre agent pathogène qui peut être transmis de l'espèce d'origine à l'espèce devant être vaccinée ou à tout autre espèce animale entrant en contact avec les animaux vaccinés. Pour la production des vaccins aviaires et pour les

procédures de contrôle de ces vaccins, il est recommandé d'utiliser des œufs embryonnés de poules indemnes d'agents pathogènes spécifiques.

3. Chaque lot de vaccin doit satisfaire à un test de stérilité qui est semblable à celui qui est décrit dans les méthodes publiées (réf. 1 à 3 et 6).
4. Chaque lot de vaccin doit satisfaire à des tests appropriés pour montrer que la suspension vaccinale est indemne de tout virus étranger (Ces tests comprennent des tests en cultures cellulaires sensibles aux virus de l'espèce devant être vaccinée, des tests sur œufs embryonnés, et si nécessaire des tests sur animaux).
5. Certains pays imposent que chaque lot de vaccin soit indemne de mycoplasmes. Des tests de contrôle appropriés ont été publiés (1, 2, 6).
6. Des tests montrant l'absence de certaines bactéries spécifiques comme *Salmonella pullorum*, *Mycobacterium tuberculosis* et *M. paratuberculosis*, *Brucella* spp. et *Leptospira* spp. peuvent être exigés (1, 2).

C. VACCINS À VIRUS NON INACTIVÉS ADMINISTRÉS DANS L'EAU DE BOISSON, PAR NÉBULISATION OU PAR SCARIFICATION CUTANÉE

1. Appliquer les paragraphes B.1, 2, 4, 5 et 6.
2. Un nombre limité de contaminants, de bactéries et champignons non pathogènes peuvent être admis (voir la section J.2.5, ci-dessous).

D. VACCINS À VIRUS INACTIVÉS

1. Appliquer les paragraphes B.1, 2 et 3.
2. Chaque lot de vaccin devra satisfaire au test concernant le contrôle de l'inactivation. Celui-ci est réalisé avant l'addition d'agents de conservation. La procédure d'inactivation et les tests utilisés pour détecter les virus vivants après inactivation doivent être validés et en adéquation avec l'objectif fixé.
3. La preuve que la méthode d'inactivation inactive aussi des agents pathogènes typiques peut s'avérer nécessaire à moins que le vaccin ne satisfasse aux conditions des paragraphes B.4 et B. 5.

E. VACCINS À BACTÉRIES VIVANTES

1. Appliquer le paragraphe B.1.
2. L'absence de contaminants fongiques, bactériens et mycoplasmiques doit être montrée au niveau des lots de semence de bactéries.
3. Un test de pureté de souche bactérienne doit être réalisé sur chaque lot de vaccin en utilisant un milieu solide et en ne tenant pas compte de la croissance de la souche bactérienne vaccinale.
4. Certains pays imposent que chaque lot de vaccin bactérien soit indemne de mycoplasmes. Des tests de contrôle appropriés ont été publiés (réf. 6 et pour les mycoplasmes aviaires, réf. 2).

F. VACCINS À BACTÉRIES INACTIVÉES

1. Appliquer les paragraphes B.1, B.3, et E.2.
2. Chaque lot de vaccin devra satisfaire le test concernant le contrôle de l'inactivation des bactéries. Le test de stérilité peut convenir pour ce sujet s'il est adapté.

G. SÉRUMS ADMINISTRÉS AUX ANIMAUX

1. Appliquer le paragraphe B.1. Certains pays exigent que tous les animaux donneurs soient soumis à une quarantaine, soient munis d'un certificat de santé et qu'ils soient soumis à des tests pour des maladies spécifiques.
2. Appliquer le paragraphe B.2 ou E.2, en fonction de la nature virale ou bactérienne de l'antigène utilisé pour produire le sérum.
3. Chaque lot de vaccin doit répondre à un test de stérilité. Des méthodes sont disponibles et ont été publiées (1, 2).
4. Chaque lot de sérum doit satisfaire aux tests appropriés pour montrer que le sérum est exempt de tout virus étranger (ces tests comprennent les tests en cultures cellulaires sensibles aux virus de l'espèce devant être traitée par le sérum, des tests sur œufs embryonnés, et si nécessaire des tests sur animaux).
5. Certains pays imposent que chaque lot de sérum soit exempt de mycoplasmes. Des tests de contrôle ont été décrits (réf. 6 et pour les mycoplasmes aviaires, réf. 2).

H. RÉACTIFS DIAGNOSTIQUES ADMINISTRÉS AUX ANIMAUX

1. Appliquer les paragraphes B.1 et B.3.
2. Les paragraphes B.2 et D.2 doivent être appliqués si un virus est utilisé dans la production du réactif de diagnostic et les paragraphes E.2 et F.2, si une bactérie est utilisée.

I. EMBRYONS, OVULES, ET SPERME

Des règles spécifiques doivent être suivies si des embryons, ovules ou sperme sont utilisés (4).

J. EXEMPLES DE PROTOCOLE

1. Procédures générales

Les matières premières utilisées pour la production de produits biologiques doivent être stérilisées et/ou testées pour montrer l'absence de contaminant avant leur emploi. Les contaminants bactériens, viraux ou mycoplasmatiques seront recherchés dans des échantillons du produit biologique fini.

Les tests décrits dans le présent chapitre pour la recherche de bactéries, de mycoplasmes, de virus ou de champignons proviennent de différentes sources et ils sont donnés à titre d'exemples qui peuvent être utilisés avec confiance.

2. Détection de bactéries et champignons

Ces tests décrivent les produits et méthodes qui sont utilisés pour la détection de bactéries et champignons soit par la méthode de filtration sur membrane, soit par l'inoculation directe de milieu liquide utilisé pour les produits ne permettant pas la filtration sur membrane.

2.1. Procédure générale pour détecter des bactéries ou champignons viables

Les tests normalisés pour détecter des bactéries ou champignons étrangers dans les matières premières brutes, les lots de semence ou le produit fini sont : le test de filtration sur membrane ou le test de stérilité par l'inoculation directe.

Pour la technique de filtration sur membrane, un filtre disposant d'une porosité nominale ne dépassant pas 0,45 µm et ayant un diamètre d'au moins 47 mm devra être utilisé. Les filtres en nitrate de cellulose doivent être utilisés si le matériel est aqueux ou huileux ; des filtres à base d'acétate de cellulose seront utilisés si le matériel est fortement alcoolique, huileux ou s'il renferme un adjuvant huileux. Le filtre est imbibé avec

20 à 25 ml de diluant A ou B immédiatement avant que le contenu du récipient ou des récipients devant être testés ne soit filtré.

Diluant A – pour les produits ou matières premières aqueuses : dissoudre 1 g d'hydrolysate peptique de tissu animal dans de l'eau et porter à 1 litre, filtrer ou centrifuger pour clarifier, ajuster le pH à $7,1 \pm 0,2$, répartir dans des flacons de 100 ml et stériliser à la vapeur.

Diluant B – pour les produits à base d'adjuvant huileux ou matières premières huileuses : ajouter 1 ml de polysorbate 80 à 1 litre de Diluant A, ajuster le pH à $7,1 \pm 0,2$, répartir dans des flacons de 100 ml et stériliser à la vapeur.

Si le produit biologique devant être testé a des propriétés anti-microbiennes, la membrane est lavée 3 fois après l'application de l'échantillon avec environ 100 ml du diluant approprié (A ou B). La membrane est ensuite transférée en totalité sur un milieu de culture, coupée de façon aseptique en parties égales dans le milieu ou bien le milieu est transféré sur la membrane en utilisant l'appareil à filtration. Si l'échantillon à tester contient du merthiolate comme agent de conservation, le milieu liquide au thyoglycollate (FTM pour *Fluid Thioglycollate Medium*) est utilisé et les membranes sont incubées entre 30 °C et 35 °C et 20 °C et 25 °C. Si l'échantillon à tester est un produit biologique inactivé sans conservateur à base de merthiolate, le FTM est utilisé entre 30 °C et 35 °C et le milieu à base d'hydrolysate de caséine de soja (SCDM, *Soybean Casein Digest Medium*) entre 20 °C et 25 °C. Si l'échantillon testé est une suspension virale non inactivée, le milieu SCDM est utilisé aux deux températures d'incubation. Il a été suggéré récemment d'utiliser de la gélose sulfite de polymyxine-sulfadiazine pour améliorer la détection de *Clostridium* spp. quand la technique de filtration sur membrane est employée (5).

Si une inoculation directe du milieu de culture est choisie, une pipette stérile ou une seringue et une aiguille sont utilisées pour transférer aseptiquement le matériel biologique directement dans le milieu liquide. Si le produit biologique devant être testé a des propriétés anti-microbiennes, le ratio inoculum/volume de culture du milieu doit être déterminé avant de débiter le test. Afin de déterminer le volume de milieu approprié pour négativer l'activité anti-microbienne, 100 unités formant colonie (UFC) d'un micro-organisme témoin listé dans le tableau 1 sont utilisées. Si le produit à tester contient du merthiolate comme agent de conservation, le FTM est utilisé aux températures entre 30 °C et 35 °C et 20 °C et 25 °C comme contrôle. La croissance doit être nettement visible après un temps d'incubation approprié (voir paragraphe J.2.2). Si le produit à tester est inactivé et ne contient ni merthiolate ni bactéries vivantes, le FTM est utilisé entre 30 et 35 °C et le SCDM entre 20 °C et 25 °C. Si le produit à tester est constitué d'une suspension virale non inactivée, le SCDM est utilisé aux 2 températures d'inactivation. Si le vaccin bactérien inactivé renferme des clostridies ou contient un composant dérivant de clostridies, l'utilisation de FTM avec 0,5 % d'extrait de bœuf (FTMB) au lieu du FTM est préférée. Il peut être souhaitable d'utiliser à la fois le FTM et le SCDM pour tous les tests.

Tableau 1. Souches de la collection de culture de référence (ATCC)¹ avec leur milieu respectif de croissance et les conditions d'incubation.

Milieu	Micro-organisme témoin	Incubation	
		Température (°C)	Conditions
FTM	<i>Bacillus subtilis</i> -ATCC # 6633	30 à 35	Aérobic
FTM	<i>Candida krusei</i> -ATCC # 6258	20 à 25	Aérobic
SCDM	<i>Bacillus subtilis</i> -ATCC # 6633	30 à 35	Aérobic
SCDM	<i>Candida krusei</i> -ATCC # 6258	20 à 25	Aérobic
FTMB	<i>Clostridium sporogenes</i> -ATCC # 11437	30 à 35	Anaérobic
FTMB	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC #6538	30 à 35	Aérobic

Pour les deux tests de stérilité par filtration sur membrane ou inoculation directe, au minimum 14 jours d'incubation sont nécessaires à tous les milieux. Les milieux sont examinés à intervalles réguliers et après 14 jours d'incubation pour rechercher une croissance microbienne qui sera confirmée par une sous-culture et une coloration de Gram.

¹ American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA.

2.2. Stimulation de la croissance et interférence du test

La stérilité du milieu doit être confirmée en incubant des flacons représentatifs à la température appropriée et pendant le temps nécessaire spécifié pour chaque test.

La capacité du milieu de culture pour supporter une croissance en présence ou absence du produit biologique, de composants du produit, de cellules, de semences, ou d'autres produits doit être validée pour chaque produit testé, et pour chaque nouveau lot ou préparation de milieu de culture.

Le milieu doit être inoculé avec 10 à 100 micro-organismes témoins viables appartenant à une lignée de l'*American Type Culture Collection* (ATCC) (voir note de bas de page n°1) listée dans le tableau 1, et incubé selon les recommandations de la procédure, afin de montrer que le test permet une croissance en l'absence de produit test.

Pour tester la capacité du milieu de culture à supporter la croissance en présence du produit test, les flacons doivent être inoculés simultanément avec le produit test (voir section J.2.3) et 10 à 100 micro-organismes témoins viables. Le nombre de flacons utilisés doit être égal à au moins la moitié du nombre utilisé pour tester le produit ou les composants du produit. Les milieux de culture sont satisfaisants si la croissance des micro-organismes témoins est clairement établie au cours des 7 jours suivant l'inoculation dans tous les milieux de culture. Lors d'une croissance nette de micro-organismes, il est nécessaire de confirmer la nature du micro-organisme en cause pour vérifier qu'il correspond bien à l'organisme initialement ajouté au milieu. Le test de stérilité n'est pas validé si la croissance des micro-organismes n'est pas adéquate ou si le micro-organisme trouvé ne correspond pas à l'agent ayant servi à l'inoculation.

2.3. Nombre de flacons devant être testés

Le nombre d'unité de production dans un lot détermine le nombre de flacons qui doivent être contrôlés pour leur stérilité. Si la taille du lot est inférieure à 100 unités alors 10 % d'entre elles ou 4 flacons et cela qu'elle que soit leur capacité, doivent être testés. Si le lot contient entre 100 et 500 flacons, 10 d'entre-eux doivent être testés. Si le lot a plus de 500 flacons, 2 % ou 20 flacons, (le plus petit des deux) doivent être testés. Une alternative consiste, pour les produits autres que les produits autogènes, à tester un maximum de 10 flacons pour chaque série.

La quantité de l'inoculum pour le test de stérilité dépend de la quantité de matériel biologique dans chaque flacon. Si la quantité est inférieure à 1 ml, alors le contenu total est utilisé pour chacun des milieux. Si le volume est compris entre 1 et 4 ml, alors la moitié de cette teneur est utilisée pour chaque milieu. Si la quantité est comprise entre 4 et 20 ml, un inoculum de 20 ml par milieu est utilisé. Si la quantité dans chaque flacon est comprise entre 20 et 100 ml, 10 % du volume sont utilisés par milieu. Si la quantité dépasse 100 ml par flacon, alors on utilise 10 % ou 50 ml (le plus grand des deux) pour inoculer chaque milieu.

2.4. Interprétation des résultats du contrôle de la stérilité

Si une croissance de micro-organismes est observée dans un milieu, mais que les témoins montrent que le milieu est impropre alors ce premier test est déclaré invalide et pourra être répété. Si une croissance microbienne est observée au cours du premier test à partir de certains flacons et qu'il n'y a pas d'invalidation du test à partir des témoins alors un deuxième test peut être conduit. Le nombre minimum de flacons, de récipients tests, de filtres dans le deuxième test est le double de celui du premier test. Si aucune croissance n'est observée dans le premier ou deuxième test, alors le produit biologique satisfait les conditions du test et est considéré comme satisfaisant en ce qui concerne la stérilité. Si une croissance microbienne est observée dans un récipient re-testé, le produit biologique est considéré comme non satisfaisant vis-à-vis de la stérilité. Cependant, si une erreur au niveau des milieux ou de la technique est prouvée à partir des témoins pour le deuxième test, alors il est possible de tester à nouveau.

2.5. Procédures générales pour tester des vaccins à virus atténué produits sur œufs et administrés dans l'eau de boisson, par nébulisation ou scarification cutanée pour tester la présence de bactéries ou de champignons

Chaque lot de flacons contenant le produit biologique final doit présenter une contamination moyenne inférieure à une colonie bactérienne ou fongique par dose pour les vaccins recommandés pour les volailles, ou 10 colonies par dose pour les autres animaux (voir Section J.2.3 ci-dessus pour déterminer le nombre d'échantillons à tester). À partir de chaque échantillon de flacons, deux boîtes de Petri sont inoculées avec 10 doses de la suspension vaccinale si le vaccin est destiné aux volailles, ou une dose s'il est recommandé pour d'autres animaux. À chaque boîte, on ajoute 20 ml de gélose à base d'infusion cœur-cerveau en

présence de 0,007 UI (Unités Internationales) de pénicillinase/ml. Une boîte devra être incubée entre 30 °C et 35 °C pendant 7 jours et la seconde devra être incubée entre 20 °C et 25 °C pendant 14 jours. Le nombre de colonies est calculé à la fin de chaque temps d'incubation. Le nombre moyen de colonies de toutes les boîtes représentant un lot doit être réalisé pour les différentes conditions d'incubation. Si le nombre moyen de colonies pour chaque condition d'incubation excède un par dose pour les vaccins recommandés aux volailles, ou 10 colonies par dose pour les vaccins destinés aux autres espèces animales au cours du premier test, un deuxième test pour éliminer toute erreur technique peut être opéré en utilisant un nombre double du conditionnement final non ouvert. Si le nombre moyen de colonies dépasse, pour les deux conditions d'incubation, 1 par dose pour les vaccins recommandés aux volailles ou 10 par dose pour les vaccins utilisés dans les autres espèces animales, alors le lot de vaccin devra être reconnu comme non satisfaisant.

2.6. Procédures générales pour tester la pureté des lots de semence de bactéries ou de produits biologiques à base de bactéries vivantes

La pureté de chaque lot de semence bactérienne ou de chaque lot de produit biologique à base de bactéries vivantes doit être testée en inoculant un milieu SCDM qui est incubé entre 20 °C et 25 °C pendant 14 jours, et un milieu FTM, qui est incubé entre 30 °C et 35 °C pendant 14 jours (voir Section J.2.3 ci-dessus pour déterminer le nombre d'échantillons devant être testé et le volume de l'inoculum à utiliser). Une pipette stérile ou une seringue et une aiguille sont utilisées pour transférer directement de façon aseptique la quantité de matériel biologique sur les 2 types de milieu de culture. Le ratio minimal inoculum/milieu de culture est de 1/15.

Si l'inoculum ou la croissance du vaccin bactérien rend le milieu turbide masquant lors d'un examen visuel la croissance d'un autre micro-organisme atypique, alors des sous-cultures sont réalisées à partir de tous les tubes ayant une turbidité entre le jour 3 et 11. Les sous-cultures sont réalisées en transférant 0,1 à 1,0 ml à différents bouillons ou boîtes de gélose et en incubant pendant une période de 14 jours. Un examen microscopique après coloration de Gram doit être également réalisé.

Si aucune croissance atypique n'est observée à partir de différents flacons tests et si le témoin positif inclus dans le test est satisfaisant, le lot du produit biologique peut être considéré comme pur. Si une croissance atypique est montrée alors que les témoins prouvent qu'il y a une insuffisance du milieu ou de la technique, le test peut être répété. Si une croissance atypique est mise en évidence avec des témoins valides, un deuxième test doit être réalisé. Le nombre de flacon testé dans le deuxième contrôle est égal au double de celui initialement testé. Si aucune croissance atypique n'est montrée dans le deuxième test, le produit biologique est considéré comme pur. Si une croissance atypique est mise en évidence dans le deuxième test, le produit biologique est considéré comme non satisfaisant en ce qui concerne la pureté. Cependant, si les témoins montrent une défaillance de la technique ou du milieu, alors un autre test peut être fait.

3. Détection de contamination par *Mycoplasma*

3.1. Procédure générale pour la détection de contamination par *Mycoplasma*

Chaque lot de vaccin à virus vivant, chaque lot de semence primaire (MSV, *Master Seed Virus*), chaque lot primaire (MCS, *Master Cell Stock*) ou secondaire de cellules, et tous les composants d'origine animale qui ne sont pas stérilisés par la vapeur doivent être testés pour déterminer l'absence de mycoplasmes. Des milieux liquides et solides qui permettent la croissance d'un petit nombre de micro-organismes tests comme les micro-organismes contaminants courants *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. orale* et *M. synoviae* devront être utilisés. Les caractéristiques nutritives du milieu solide doivent permettre la croissance d'au moins 100 UFC quand le milieu a étéensemencé avec 100 à 200 UFC par boîte. Un changement de couleur approprié doit survenir dans le milieu liquide quand environ 20 à 40 UFC de chaque micro-organisme test sont inoculées. La capacité du milieu de culture à permettre la croissance en présence de produit doit être validée pour chaque produit devant être testé, et pour chaque nouveau lot ou unité de production de milieu de culture.

Un échantillon de chaque lot de vaccin, MSV, etc., doit être testé. Quatre boîtes de milieu solide sont inoculées avec 0,25 ml de l'échantillon devant être testé, et 100 ml de milieu liquide sont ensemencés avec 10 ml de l'échantillon. Il est aussi possible d'inoculer chaque boîte avec 0,1 ml et d'inoculer 1 ml de l'échantillon à tester dans 100 ml de milieu liquide. Deux boîtes sont incubées entre 35 et 37 °C en atmosphère aérobie (atmosphère contenant 5 à 10 % de CO₂ et une humidité adéquate) et 2 boîtes sont placées en atmosphère anaérobie (atmosphère en présence d'azote contenant 5 à 10 % de CO₂ et une humidité adéquate) pendant 28 jours. Trois ou quatre jours après l'inoculation, une sous-culture avec 0,25 ml de milieu liquide est réalisée par un étalement sur 2 boîtes de milieu solide. Incuber une boîte en milieu aérobie et la seconde en milieu anaérobie entre 35 et 37 °C jusqu'au jour 28 du test. Répéter la

procédure de sous-culture aux jours 6, 7, ou 8 et également au jour 13 ou 14. Une méthode alternative consiste à pratiquer des nouvelles cultures sur milieu solide aux jours 3, 5, 10 et 14 et de les incubé pendant 14 jours. Observer le milieu liquide tous les deux à trois jours et, lors d'un changement de couleur, réaliser immédiatement une sous-culture.

3.2. Interprétation des résultats du test pour recherche de *Mycoplasma*.

À la fin de la période d'incubation (jour 28) tous les milieux solides inoculés sont examinés au microscope pour rechercher la présence de colonie de mycoplasmes. L'échantillon analysé passe le test si la croissance de colonie de mycoplasme est observée sur les témoins positifs, et si aucune croissance n'est observée sur les milieux solides inoculés avec le matériel de test. Si à un quelconque moment de l'analyse, plus d'une boîte est accidentellement contaminée avec des bactéries ou des champignons, ou est cassée, le test n'est pas validé et doit être répété. Si des colonies de mycoplasmes sont rencontrées sur des boîtes d'agar, le test devra être répété une 2^e fois pour confirmer la contamination par des mycoplasmes. Le double du volume (0,5 ml) de matériel biologique devant être testé sera utilisé pour le deuxième test. Si des colonies de mycoplasmes sont trouvées sur l'une des boîtes du deuxième test, l'échantillon est considéré comme non satisfaisant du fait d'une contamination mycoplasmaïque. Certains mycoplasmes ne peuvent pas être cultivés, auquel cas, les MSV et MCS doivent être testés en utilisant une lignée cellulaire indicatrice (Cellules Vero), ou en effectuant une coloration de l'ADN ou une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR).

4. Détection de contamination par *Salmonella*

Chaque lot de produit biologique à base de virus non inactivé produit sur œufs doit être exempt de *Salmonella*. Cette recherche doit être réalisée avant que des produits bactériostatiques ou bactéricides ne soient ajoutés. Cinq échantillons de chaque lot doivent être testés ; 5 ml ou la moitié du contenu d'un flacon (ce qui correspond à la plus faible quantité) sont utilisés pour inoculer 100 ml de bouillon de tryptose et de bouillon au tétrathionate. Les bouillons inoculés doivent être incubés pendant 18 à 24 h et entre 35 °C et 37 °C. Des inoculums sont réalisés à partir de ces bouillons pour ensemercer une gélose MacConkey et une gélose *Salmonella-Shigella* ; les milieux inoculés sont incubés pendant 18 à 24 h, et sont examinés. Si aucune croissance typique de *Salmonella* est observée, les boîtes d'agar doivent être incubées pendant 18 à 24 h et examinées à nouveau. Si des colonies typiques de *Salmonella* sont observées, une sous-culture sur des milieux sélectifs adaptés doit être réalisée pour permettre une identification positive. Si une *Salmonella* est isolée, le lot du produit biologique est considéré comme non satisfaisant.

5. Détection de virus dans les produits biologiques

Les produits biologiques qui sont susceptibles d'héberger des virus et qui ne peuvent pas subir une stérilisation avant leur utilisation doivent être testés avant leur emploi. Ce sont les produits dérivés d'animaux (par exemple le sérum), des cellules primaires, des lignées cellulaires ou des stocks viraux de semence. Différents tests ont été décrits pour identifier des contaminants viraux : mise en évidence d'effet cytopathogène (ECP), hémadsorption, hémagglutination, techniques à base d'anticorps fluorescents et toutes autres méthodes adéquates, par exemple la PCR ou la méthode immuno-enzymatique ELISA. Tous les produits biologiques doivent être spécifiquement testés pour la présence de pestivirus. Les produits biologiques et les vaccins aviaires doivent être inoculés sur des cultures cellulaires de première explantation, sur des œufs et/ou chez des poussins pour la détection de virus aviaires. En plus de rechercher un ECP ou des modifications cellulaires dans les cellules, les œufs ou les poussins, il convient de pratiquer des tests pour la recherche de virus hémadsorbants et hémagglutinants.

Les cellules doivent être testées de la manière suivante. Au jour 0, les cellules congelées ou primaires devant être testées sont ensemencées dans des flacons de 75 cm² (ou semblable) ; 7 jours plus tard, au moins 2 flacons de 75 cm² sont préparés. Au jour 14, un flacon est utilisé pour tester les cellules pour un ECP, pour réaliser une hémadsorption et une immunofluorescence (procédures ci-dessous). L'autre flacon est soumis à un deuxième passage et au jour 21, 3 cycles de congélation-décongélation sont réalisés. Il est aussi possible de congeler-décongeler les cellules au jour 21, plutôt qu'au jour 26. À l'issue de ce traitement, les cellules sont centrifugées à 2 000 *g* pendant 10 min, et le surnageant est utilisé pour inoculer des cellules appropriées sensibles à des virus par exemple des cellules sensibles à des virus que l'on peut retrouver dans l'espèce animale à partir de laquelle les cellules ont été obtenues ou bien encore des cellules sensibles aux virus qui peuvent survenir chez des animaux pour lesquels les prélèvements sont en cours d'utilisation et des cellules sensibles aux virus de la peste. Ces cellules sont soumises à 2 passages espacés de 7 jours, et sont testées pour un ECP ; une hémadsorption et une immunofluorescence sont réalisées.

Les substances d'origine animale sont testées sur les cellules rénales du singe vert africain (Vero) et sur une lignée cellulaire ou une culture primaire dérivées de la même espèce que les substances éprouvées. Les cellules sont inoculées en flacons de 75 cm² avec 3,75 ml de matériel test repris dans 25 ml de milieu ou 15 % de la

substance à tester (choisir le plus faible volume). Les cellules sont repiquées 2 ou 3 fois à 7 jours d'intervalle et sont testées pour un ECP ; une hémadSORption et une immunofluorescence. Les cellules doivent être observées pour un ECP tous les deux à trois jours, et avant chaque sous-culture, pendant la période d'incubation.

Les semences primaires sont testées sur cellules VERO, sur des lignées cellulaires continues ou des cultures primaires dérivant des espèces auxquelles le produit est destiné. Elles sont également testées sur des lignées cellulaires continues ou des cultures primaires dérivant de l'espèce productrice du produit (si celle-ci est différente de l'espèce destinatrice).

Pour chaque type cellulaire exigeant un contrôle, 1 ml de MSV à tester est décongelé ou reconstitué et neutralisé par l'addition de 1 ml d'antisérum monospécifique. Le sérum doit être dépourvu d'anticorps dirigés contre les contaminants pour lesquels le test est développé. Les antisérums doivent aussi être testés pour vérifier l'absence d'effets inhibiteurs non spécifiques. Au moins deux types cellulaires sont toujours requis avec un minimum de 2 ml de MSV et 2 ml d'antisérum. L'antisérum assure une neutralisation virale à température ambiante en 1 h. 2 ml du mélange MSV/antisérum sont inoculés à des flacons de 75 cm² contenant les cellules appropriées. Si la semence primaire présente un titre élevé ou est difficile à neutraliser ou si l'antisérum a un titre faible, l'antisérum peut être ajouté au milieu de culture à la concentration finale de 1 à 5 %. Les cellules doivent être repiquées au moins deux fois pendant une période de 14 jours et la culture finale est examinée pour un ECP ; une hémadSORption et une immunofluorescence sont également réalisées.

La coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) est utilisée pour détecter un ECP provoqué par des virus adventices. Des tapis cellulaires sont préparés sur des lames pour culture cellulaire à deux chambres ; les tapis sont incubés pendant 7 jours. Les puits en plastique de la lame sont retirés en prenant soin de laisser la base en caoutchouc fixée sur la lame. Les lames sont lavées dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) de Dulbecco, puis sont fixées à l'alcool et placées sur un portoir pour la coloration. Les lames sont colorées pendant 15 min à la température ambiante avec le MGG dilué au 1/5 dans du méthanol absolu. Le colorant est retiré en inversant les lames. Les lames sont ensuite colorées pendant 20 min avec le colorant dilué au 1/15 dans de l'eau désionisée. Le colorant est retiré en inversant les lames et en les rinçant avec de l'eau désionisée pendant 10 à 20 s. Les lames sont séchées à l'air et une lamelle est appliquée avec une goutte d'huile de paraffine. Le colorant MGG permettra de différencier les nucléoprotéines à base d'ADN de celles à base d'ARN. Les nucléoprotéines à base d'ADN sont colorées en rouge-pourpre alors que les nucléoprotéines à base d'ARN sont colorées en bleu. Les tapis cellulaires sont examinés avec un microscope conventionnel pour la recherche de corps d'inclusion, d'un nombre anormal de cellules géantes ou de tout autre ECP attribuable au contaminant viral. Les tapis inoculés sont comparés avec les tapis non inoculés. Si un ECP attribuable à un virus étranger est trouvé, le produit testé doit être considéré comme non satisfaisant.

La détection de virus étrangers provoquant une hémadSORption dans des cellules infectées est généralement réalisée sur des tapis ayant un deuxième passage du produit biologique testé et inoculé à un tapis cellulaire ; le même test est réalisé avec un tapis cellulaire non inoculé. Le tapis cellulaire est généralement préparé dans un flacon en plastique de 75 cm². Des hématies de cobaye, poulet ou tout autre animal de laboratoire sont collectées dans un volume égal de solution d'Alsever. Le sang peut être conservé à 4 °C pendant 7 jours s'il est lavé plusieurs fois dans une solution d'Alsever avant un stockage dans un volume égal de solution d'Alsever. Avant leur utilisation, les érythrocytes sont à nouveau lavés en ajoutant 5 ml de la suspension dans la solution d'Alsever à 45 ml de PBS sans calcium et sans magnésium ; la solution est centrifugée à 500 *g* pendant 10 min. Le surnageant est retiré par aspiration et les érythrocytes sont repris dans du PBS avant d'être centrifugés à nouveau. Cette procédure de lavage est répétée au moins 2 fois jusqu'à ce que le surnageant soit clair. Les érythrocytes de chaque espèce sont mélangés en ajoutant 0,1 ml de chacun des types de cellules sédimentées à 100 ml de PBS. Les érythrocytes des différentes espèces peuvent être gardés séparés ou mélangés. Sont ajoutés à chaque flacon 5 ml de la suspension d'érythrocytes ; une incubation de 30 min à 4 °C est réalisée. Les tapis cellulaires sont lavés 2 fois avec du PBS et sont examinés pour leur hémadSORption. Si aucune hémadSORption n'est visible, 5 ml de la suspension d'érythrocytes sont ajoutés à chaque flacon et sont incubés entre 20 et 25 °C pendant 30 min ; les tapis sont rincés comme précédemment et sont examinés pour leur hémadSORption. Des flacons différents peuvent être utilisés pour chaque température d'incubation en cas de besoin. Les tapis cellulaires sont examinés macroscopiquement (en utilisant un transilluminateur) et au microscope. Il est important de comparer les tapis inoculés avec les tapis témoins non inoculés afin d'identifier une hémadSORption non spécifique qui peut survenir avec certains types cellulaires. L'utilisation de PBS sans calcium et sans magnésium et des hématies fraîches doit empêcher la plupart des hémadSORptions non spécifiques. Si une hémadSORption spécifique est liée à un agent étranger, le produit biologique testé doit être considéré comme non satisfaisant.

Les tests pour détecter des virus étrangers par immunofluorescence utilisent en général des tapis cellulaires du deuxième passage du produit biologique testé ; une comparaison est réalisée avec des tapis cellulaires non inoculés. Les tapis cellulaires sont constitués de lames avec 8 puits de culture. Une lame témoin positif (avec

8 puits ensemencés) est réalisée avec chaque conjugué antiviral en inoculant chaque tapis cellulaire avec 100 DICT₅₀ (dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) du virus approprié. Trois groupes de tapis cellulaire sont colorés avec le conjugué antiviral. Le Groupe 1 est constitué par le deuxième passage du produit biologique inoculé à des cellules ; le Groupe 2 correspond au deuxième passage du tapis cellulaire non inoculé et le Groupe 3 correspond au deuxième passage du tapis cellulaire non inoculé (pour la production du témoin culture cellulaire positif). Lors de la coloration, les bords des puits sont enlevés, mais le joint de caoutchouc est laissé en place sur la lame. Les lames sont lavées dans un milieu PBS de Dulbecco puis sont fixées pendant au moins 10 min dans de l'acétone à 4 °C et sont séchées. Environ 0,1 ml de chacun des conjugués est placé au centre de chaque puits d'une lame des Groupes 1 et 2 ainsi que dans les puits du témoin positif du groupe 3. Les lames sont incubées dans une chambre humide à 37 °C pendant 30 min, et sont rincées une fois avec du PBS de Dulbecco ; les lames sont ensuite placées dans un bac contenant du PBS de Dulbecco pendant 10 min. Les lames sont ensuite lavées de façon intensive avec de l'eau désionisée avant d'être séchées. Toutes les lames sont observées pour rechercher une fluorescence spécifique attribuable à un virus particulier. Trois lames de chacun des groupes, marquées par un même fluorochrome, sont comparées. Si la lame préparée à partir des cellules inoculées avec le produit biologique testé, présente une fluorescence spécifique de fluorescence virale, alors le MSV doit être considéré comme non satisfaisant.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. CODE OF FEDERAL REGULATIONS (2007). Animals and Animal Products, Title 9, Parts 1–199. The Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration. US Government Printing Office, Washington DC, USA.
2. COUNCIL OF EUROPE (2006). European Pharmacopoeia, Fifth Edition. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France. ISBN 92-871- 4587-3.
3. EUROPEAN UNION (1999). The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Eudralex, Vols 4-9. Office Publications of the European Communities, Luxembourg.
4. HARE W.C.D. (1985). Diseases transmissible by semen and embryo transfer techniques. OIE Technical Series No. 4. OIE, Paris, France. ISBN 92-9044-164-1.
5. TELLEZ S., CASIMIRO R., VELA A.I., FERNANDEZ-GARAYZABAL J.F., EZQUERRA R., LATRE M.V., BRIONES V., GOYACHE J., BULLIDO R., ARBOIX M. & DOMINGUEZ L. (2005). Unexpected inefficiency of the European pharmacopoeia sterility test for detecting contamination in clostridial vaccines. *Vaccine*, **24**, 1710–1715.
6. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1998). WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organization Technical Report Series, Report No. 858. World Health Organization, Geneva, Switzerland. ISBN 92-4-120878-3.

AUTRES LECTURES

Des détails sur les méthodes et les milieux de cultures seront trouvés dans les ouvrages suivants ainsi que dans les catalogues commerciaux.

- A. BARROW G.I. & FELTHAM R.K.A. eds. (1993). Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, Third Edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- B. CODE OF FEDERAL REGULATIONS (2003) Subchapter E. Viruses, serums, toxins, and analogous products; organisms and vectors. *In*: Code of Federal Regulation, Animals and Animal Products, Title 9, Parts 101–124. The Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, USA, 557–737.
- C. COLLINS C.H., LYNE P.M. & GRANGE J.M., eds. (1995). Collins and Lyne's Microbiological Methods, Seventh Edition. Butterworth Heinemann, Oxford, UK.
- D. MURRAY P.R., ed. (2003). Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA.

*
* *

ANNEXE 1.1.9.1.

ANALYSE DE RISQUE RELATIVE AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE VÉTÉRINAIRE AUTRES QUE LES VACCINS

INTRODUCTION

Aux fins de l'application des dispositions énoncées dans le présent chapitre, on entend par « produits biologiques » les « produits biologiques à usage vétérinaire autres que les vaccins ».

CLASSIFICATION DES PRODUITS BIOLOGIQUES

La classification est un moyen de faciliter l'*analyse de risque* relative aux *échanges internationaux* de produits biologiques.

Le système de classification doit tenir compte de l'origine, la nature et la destination déclarée des produits biologiques. En procédant à des *analyses de risque* de portée générale, et en mettant au point des procédures générales de certification et d'assurance qualité, la fourniture de produits peut être assurée en permanence sans avoir à répéter les procédures d'*appréciation de risque*, qui sont onéreuses et mobilisent des ressources importantes. Une fois réalisée, l'*appréciation du risque* peut être mise en relation avec les paramètres appropriés relatifs à la fabrication et au contrôle. Les catégories de produits biologiques à usage vétérinaire pouvant faire l'objet d'appréciations génériques des risques sont les suivantes (liste présentée sans ordre d'importance du risque) :

1. produits de synthèse ;
2. acides aminés, alcools, esters, sucres et vitamines ;
3. produits cosmétiques ;
4. extraits végétaux et substances biochimiques traitées d'origine végétale ;
5. produits obtenus par fermentation microbienne ;
6. kits de diagnostic, analytiques et immunochimiques pour usage in vitro ;
7. produits d'origine humaine ;
8. produits thérapeutiques ;
9. implants d'origine animale ;
10. anticorps et immunoglobulines ;
11. acide désoxyribonucléique (ADN), acide ribonucléique (ARN), enzymes de restriction et autres produits issus de la biologie moléculaire ;
12. lignées cellulaires et hybridomes ;
13. protéines animales, hormones, enzymes, albumines, extraits tissulaires et milieux de culture contenant des produits d'origine animale ;
14. sérum animal ;
15. micro-organismes (conventionnels ou génétiquement modifiés) ;
16. agents probiotiques ;
17. prélèvements conservés, lames et frottis pour examens microscopiques.

Selon leur origine et les procédures de traitement appliquées, tous ces produits peuvent contenir des agents pathogènes.

INFORMATION À FOURNIR LORS DE LA DEMANDE D'AUTORISATION D'IMPORTATION

Pour procéder à une analyse de risque relative aux produits biologiques, les Autorités vétérinaires doivent suivre les recommandations du Manuel terrestre. Le fabricant ou les Autorités vétérinaires du pays exportateur doivent fournir, de façon confidentielle si nécessaire, des informations détaillées sur l'origine des composants employés pour la fabrication du produit (substrats, par exemple). Ils doivent aussi donner des précisions sur le procédé de fabrication (et d'inactivation, s'il y a lieu) utilisé pour les substrats et les composants, sur les procédures d'assurance qualité appliquées à toutes les étapes du processus, sur les protocoles de contrôle du produit fini et sur la pharmacopée à laquelle le produit doit être conforme dans le pays d'origine. Ils doivent également mettre à disposition les souches d'épreuve utilisées, en précisant leurs biotypes ainsi que les sérums de référence correspondants, et tout autre moyen de contrôle approprié du produit.

PROCESSUS D'ANALYSE DE RISQUE

L'*analyse de risque* doit être aussi objective et transparente que possible et se dérouler conformément aux dispositions énoncées au titre 1.3. du *Code terrestre* ; de même, la procédure de certification doit être conforme aux dispositions énoncées au titre 1.2. du *Code terrestre*. Pour l'essentiel, l'évaluation des facteurs pays et marchandise ainsi que les mesures de réduction des *risques* reposent nécessairement sur les données fournies par le fabricant. Ces données dépendent de l'assurance qualité appliquée à toutes les étapes de la fabrication et non du seul contrôle exercé sur le produit fini.

Le degré d'exposition à l'intérieur du pays peut varier en fonction de l'usage autorisé du produit dans le pays concerné. Les *Autorités vétérinaires* peuvent limiter l'utilisation de certains produits (aux établissements dotés d'installations de sécurité biologique adaptées, par exemple).

CONFINEMENT BIOLOGIQUE

Des méthodes adaptées de confinement biologique peuvent être nécessaires pour de nombreux types de produits biologiques. En particulier, l'importation de micro-organismes exotiques doit s'effectuer dans les conditions prévues au chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries ».

*
* *

LIGNES DIRECTRICES POUR LES NORMES INTERNATIONALES APPLICABLES AUX BANQUES DE VACCINS

INTRODUCTION

La vaccination d'urgence est l'une des nombreuses mesures qui peut être utilisée pour contrôler une maladie puisqu'elle apporte un précieux complément à l'application des mesures zoosanitaires essentielles. Celles-ci comprennent le diagnostic rapide, la traçabilité, le contrôle des mouvements et la désinfection, et peuvent aussi inclure l'abattage d'animaux infectés ou ayant été en contact avec l'agent pathogène.

Les termes « vaccin d'urgence » et « vaccination d'urgence » peuvent avoir différentes connotations, mais sont habituellement utilisés pour différencier une vaccination de routine, prophylactique (préventive) et une vaccination d'urgence, cette dernière étant appliquée en réponse immédiate à une épizootie. La vaccination d'urgence peut être mise en place dans un certain nombre de circonstances et de différentes façons, incluant notamment :

- a) lors d'une épizootie dans un pays qui est normalement indemne de cette maladie et qui ne pratique pas la vaccination contre cette maladie. Elle peut être appliquée comme **Vaccination en anneau** ou **Vaccination frontière**, en dehors ou autour d'un foyer de maladie pour empêcher sa diffusion vers l'extérieur ;*
- b) lors d'une épizootie dans un pays voisin ou une région quand la **Vaccination frontière** d'urgence peut être appliquée le long de cette frontière dans le pays ou la région qui présente un risque ;*
- c) comme mesure complémentaire dans le cadre d'une éradication, quand la vaccination d'urgence est appliquée vis-à-vis d'une population animale autour d'une zone d'épizootie, habituellement au sein de la zone de protection dans laquelle les épizooties sont apparues, par la vaccination dite **Vaccination suppressive** ou **Vaccination d'étouffement**. Il s'agit d'une forme de vaccination en anneau suivie par l'abattage des animaux vaccinés.*
- d) lors d'une épizootie dans un pays qui ne pratique pas normalement la vaccination mais où les vaccins d'urgence sont utilisés pour stimuler l'immunité existante ;*
- e) lors d'une épizootie dans un pays qui pratique habituellement la vaccination préventive, mais où le(s) vaccin(s) employé(s) ne procure(nt) pas de protection contre la souche impliquée dans l'épizootie.*

Les critères qui déterminent le succès de la mise en place d'une vaccination d'urgence incluent la rapidité d'accès au(x) vaccin(s) qui (i) contient la(les) souche(s) de virus ayant une antigénicité suffisamment proche de la(les) souche(s) de l'épizootie (ii) sont du type de formulation de vaccin requis (iii) ont une innocuité et une efficacité acceptables (iv) ont une disponibilité appropriée, en terme de quantité et de livraison immédiate et (v) sont en accord avec les considérations financières. Le besoin évident de maintenir des réserves stratégiques, ou des banques, de produits ayant ces valeurs est bien illustré par les vaccins contre la fièvre aphteuse (FA). Ils sont prévus dans des plans d'urgence pour être utilisés lors d'une épizootie de FA et ont conduit à une montée en puissance dans l'établissement au niveau national et international de réserves de vaccins contre

la FA pour une utilisation au niveau mondial (3), avec l'assurance que le vaccin sera disponible immédiatement et mis à la disposition du pays demandeur.

Les vaccins d'urgence contre la FA sont habituellement formulés à un niveau d'efficacité plus élevée que le vaccin conventionnel équivalent et certaines banques stipulent la nécessité d'au moins 6 DP₅₀ (50 % de la dose protectrice) par dose pour un bovin par opposition à la dose réglementaire minimale nécessaire de 3 DP₅₀. Une efficacité plus élevée peut être atteinte en augmentant simplement la charge d'antigène par dose et le bénéfice peut inclure la rapidité, l'amplitude et la durée de la réponse protectrice (1, 4). Cependant, des vaccins conventionnels peuvent aussi être utilisés en cas d'urgence, particulièrement lorsqu'un vaccin constitué de la souche appropriée est immédiatement disponible ou lorsqu'une re-vaccination est souhaitable dans une population déjà pré-immunisée.

Le concept des banques de vaccins, illustré par la FA, et la confiance croissante en de telles banques indiquent qu'elles sont un véritable complément aux autres mesures de contrôle qui peuvent être utilement adoptées pour un certain nombre d'autres maladies comme la fièvre catarrhale du mouton, la peste porcine classique et la grippe aviaire.

DÉFINITION D'UNE BANQUE DE VACCIN

Les réserves stratégiques, ou les banques comme elles sont le plus communément appelées, sont de deux types. Elles peuvent contenir le produit fini, un vaccin formulé prêt à l'emploi, et/ou un composant antigénique, qui peut être conservé pendant une période de temps très longue pour une formulation ultérieure dans un vaccin comme et quand cela est nécessaire. Pour la FA, le composant antigénique a été plus couramment adopté parce qu'il est économiquement avantageux, et il évite le remplacement constant des vaccins qui dépassent leur date de validité. Des réserves de sécurité d'antigènes, ou de vaccins prêts à l'emploi, seront référencées comme banques de vaccins dans ce chapitre.

TYPES DE BANQUES DE VACCINS

Un pays peut détenir sa propre banque nationale et/ou il peut faire partie d'un groupe plus grand de pays ayant déterminé des droits et qui partage une banque comme c'est le cas pour l'Amérique du Nord ou l'Union Européenne pour les banques de vaccins contre la FA. De tels consortiums peuvent partager une région géographique commune, ou avoir des statuts de maladies et une approche de contrôle similaires. La banque peut être maintenue sur le territoire de l'un ou de plusieurs de ses membres ou être détenue par le producteur, et, si elle est sous forme d'antigène, elle sera formulée pour une utilisation soit par le producteur, soit maintenue par les membres de la banque dans une enceinte dédiée. Cependant, dans ce dernier cas, du fait des demandes récentes croissantes formulées par les autorités réglementaires qui souhaitent obtenir les mêmes normes concernant les installations des producteurs indépendants (comme c'est le cas dans le secteur privé avec les produits mis sur le marché), cela rend cette option très difficile à concrétiser. Dans le cas d'une banque d'antigène, un contrat entre les autorités et le fabricant de vaccin (formulation et conditionnement) doit clairement définir dans le détail la formulation du vaccin, par exemple : le temps nécessaire depuis la réception de la commande jusqu'à sa livraison, la disponibilité des solutés et des ampoules, etc.

Le lieu où sont stockés les antigènes est d'une importance vitale à partir du moment où la formulation du vaccin peut nécessiter un approvisionnement en antigène par le fabricant du vaccin et ainsi nécessiter un délai dans l'approvisionnement. Même s'il est vrai que les antigènes sont produits par le secteur privé, des délais, suite à une demande d'approvisionnement pour un vaccin en urgence, peuvent cependant encore se produire si le fabricant d'antigène est à ce moment dans sa phase de production à mi-régime du produit, et cela même si le fabricant dispose d'infrastructure disponible, car le temps nécessaire à la production devrait obligatoirement être compris entre 48 à 72 h. De tels délais dans la fabrication et la livraison des vaccins d'urgence pour circonscrire une épizootie peut amener à une propagation de la maladie et, par la suite, à des difficultés pour la maîtriser. Des vaccins déjà formulés permettraient, bien entendu, une disponibilité immédiate. Cependant, au-delà de la perte de temps et d'argent qui résulterait du remplacement régulier des vaccins, ces derniers pourraient de surcroît ne pas toujours contenir la souche la plus appropriée pour faire face à l'épizootie.

Les avantages économiques de disposer d'une banque partagée sont évidents, mais ils fournissent également l'opportunité de disposer d'un stock plus grand de réserve de doses et d'un nombre de souches vaccinales plus large, réduisant ainsi le problème de décider de l'introduction d'une gamme réduite de souches vaccinales. La collaboration entre les banques de vaccin constituerait également un moyen économique d'augmenter la capacité de disposer de vaccins d'urgence. La plus grande attention doit être apportée pour s'assurer que les banques qui collaborent entre elles opèrent avec les mêmes normes, que les droits de distribution des vaccins sont clairement définis et enfin que des contacts réguliers sont maintenus entre les banques pour s'assurer de l'innocuité,

l'efficacité et la disponibilité des vaccins. Il est nécessaire également que tout ce qui est relatif aux questions de réglementation soit abordé le plus tôt possible afin de s'assurer que les vaccins produits par la banque reçoivent une autorisation de commercialisation dans tous les pays participant à cette banque.

SÉLECTION DES VACCINS POUR UNE BANQUE

En fonction de la maladie et de la probabilité de besoins éventuels, une gamme de souches vaccinales peut être nécessaire. Les autorités de contrôle des maladies en concertation avec les administrateurs de la banque de vaccin décident des souches de vaccins qui doivent être maintenues et sur quelles bases elles doivent être conservées (ex : sous forme d'un antigène séparé pour une formulation ultérieure, ou sous forme d'une formulation prête à l'emploi). La valeur de chaque banque de vaccins est très dépendante de l'adéquation de son contenu avec l'application sur le terrain, particulièrement par rapport aux maladies qui relèvent de plusieurs sérotypes et qui présentent une grande variation de souche. Le risque potentiel d'une épizootie qui n'est pas couverte de manière appropriée par un vaccin d'une banque, doit être modéré par un contrôle continu de la situation globale de la maladie et par la reconnaissance de la nécessité d'inclure des souches vaccinales supplémentaires dans les banques ou, dans le cas où aucune souche vaccinale adéquate n'est pas disponible, de les développer rapidement pour une adjonction ultérieure.

Parce que le monde est aujourd'hui une communauté interdépendante où les mouvements des personnes, des animaux et des produits animaux sont de plus en plus rapides et lointains et parce qu'il est de plus en plus probable que de manière délibérée une maladie soit introduite dans le cadre du bioterrorisme, le risque d'apparition d'une épizootie est plus grand, et réaliser des prédictions d'une menace spécifique devient plus difficile. Pour améliorer le processus de sélection des vaccins, un échange continu d'informations ainsi qu'une coopération et une collaboration plus étroite entre les différents laboratoires internationaux, régionaux et nationaux, les fabricants de vaccins et les autorités en charge des banques d'antigènes/vaccins doivent être encouragés. Les études d'analyse de risque doivent être réalisées afin d'être en mesure de classer les souches des virus qui doivent être stockées selon que la priorité soit grande, moyenne ou faible. Un lien étroit avec les laboratoires de références nationaux et internationaux est de fait recommandé puisque quelques laboratoires procurent déjà des recommandations périodiques sur les souches qui devraient être incluses dans les banques de vaccins contre la FA. Dans le contexte du risque de bioterrorisme, les autorités de contrôle des maladies doivent considérer la pertinence de restreindre la diffusion des informations liées à la conservation de stocks spécifiques d'antigènes et/ou de vaccins.

QUANTITÉS DE VACCIN NÉCESSAIRES DANS UNE BANQUE

Décider du nombre de doses nécessaires de vaccin est à la fois complexe et problématique. Cela englobe les questions de sérotypes, de souches, l'utilisation de vaccins mono ou polyvalents, et le type de formulation. Les facteurs à prendre en considération comprennent le type de maladie, les différentes circonstances et manières d'appliquer des vaccinations d'urgence (items a) à e) décrits dans l'introduction), les espèces, la taille et la localisation du bétail qui doit être protégé, les considérations géographiques, la connaissance de la situation épidémiologique actuelle et la prévision globale, les analyses des risques de l'introduction et de la diffusion d'une maladie, associés avec les études coûts/bénéfices. Dans la détermination de l'approvisionnement de vaccins d'urgence, le choix de la quantité du produit implique inévitablement un compromis entre le coût d'achat et le nombre probable de doses nécessaires. Le minimum de vaccins nécessaires doit de fait être basé sur le nombre de doses qui peuvent être distribuées et appliquées dans la première semaine de vaccination, il serait souhaitable qu'un approvisionnement supplémentaire puisse se faire soit par d'autres banques soit par des sources commerciales. Par exemple, 500 000 doses bovines de différentes souches de vaccin contre la FA étaient maintenues en routine par la Banque Internationale de Vaccin contre la FA (IVB pour *International FMD Vaccine Bank*) et les retraits directs des pays membres ont variés de 100 000 à 500 000 doses bovines. Néanmoins, elles seront vite épuisées si elles sont utilisées dans une zone de forte densité en bétail.

ACQUISITION DE VACCINS POUR UNE BANQUE

En fonction du type de banque de vaccin et de la maladie concernée, l'acquisition du (des) vaccin(s) ou antigène(s) approprié(s) dépendra de leur disponibilité à partir du secteur commercial ou d'une institution gouvernementale ou produit « fait-maison ».

Le contrôle concernant les produits immunologiques de médecine vétérinaire (IVMPs pour Immunological Veterinary Medicinal Products) existant ou potentiels et le bien-fondé d'utiliser des médicaments approuvés et autorisés, prédisposera une banque pour acquérir, ou maintenir, ses vaccins et ses antigènes de manière sélective. Il est recommandé que les fabricants convenablement autorisés ayant les autorisations de commercialisation nécessaires et les normes internationalement acceptées de Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), une assurance qualité (AQ) moderne et un personnel qualifié soient utilisés comme sources autorisées.

Cela a été parfaitement illustré dans ces dernières années par les banques de vaccins contre la FA pour lesquelles il y a eu une forte préférence d'acheter et de maintenir des antigènes/vaccins au sein du secteur de fabrication commerciale et ainsi d'éviter les dépenses et les difficultés de maintenir des locaux « agréés » dédiés et soumis aux BPF pour une formulation en cas d'urgence.

Les services de contrôle des maladies doivent s'orienter vers l'option d'un appel d'offre pour les antigènes/vaccins auprès de plusieurs fournisseurs, particulièrement lorsque les considérations réglementaires sont de grande importance. Ils pourront chercher des conseils auprès des autorités de réglementation appropriés concernant les normes applicables à de tels produits. La demande d'appel d'offre peut assurer non seulement un prix compétitif, mais aussi un produit médical à usage vétérinaire fabriqué à un niveau de qualité acceptable. Elle doit aussi établir que les fournisseurs sont capables de produire le nombre de doses désiré dans une période de temps spécifiée qui satisfasse nécessairement, ou même obligatoirement, les tests de conformité tels que l'innocuité et l'efficacité.

S'il est nécessaire de maintenir les antigènes/vaccins sur un site autre que celui du site principal de fabrication, les services de contrôles des maladies peuvent souhaiter de ne l'accepter qu'après qu'il ait réussi les procédures de tests d'admission nécessaires comme l'innocuité et/ou l'efficacité. Dans le cas contraire, si l'antigène/vaccin doit être localisé dans la banque avant d'avoir rempli les tests d'admission, cet antigène/vaccin devra alors être stocké séparément et identifié comme matériel en quarantaine jusqu'à ce que les tests satisfassent complètement les exigences des banques de vaccins.

NORMES RÉGLEMENTAIRES – INOCUITÉ, EFFICACITÉ ET QUALITÉ

Les exigences réglementaires pour un produit de médecine vétérinaire doivent être prises en compte par chaque pays souhaitant avoir l'autorisation nécessaire d'utilisation du vaccin d'urgence lors d'une situation d'épizootie. Par exemple, tous les produits de médecine vétérinaire qui sont disponibles sur le marché en Union Européenne (UE) doivent présenter une autorisation de mise sur le marché et l'UE impose certaines exigences pour de telles autorisations. L'UE a également des dispositions d'urgence sous les Articles 7 et 8 qui permettent la diffusion d'un vaccin sans autorisation dans le pays qui le demande. Cependant, une directive plus récente de l'UE, 2003/85/CE, sur les règles actuelles et futures du contrôle de la FA renforce l'utilisation des vaccins comme une part d'une politique de « vacciner-pour-vivre ». Ceci rend la question de produit autorisé encore plus essentielle, particulièrement lorsque les animaux vaccinés sont destinés à la chaîne alimentaire et nécessite le soutien d'agences responsables de la santé humaine. De fait, il est important que les produits avec licence soient utilisés et que les produits sans licence soient vraiment un dernier recours.

La qualité, l'innocuité et l'efficacité sont de fait les plus importantes et varieront en fonction de la maladie. Lorsque des produits immunologiques particuliers sont couverts par des monographies individuelles dans la Pharmacopée officielle (ex : vaccin contre la FA dans la Pharmacopée Européenne – Monographie 63) alors les normes pour la sécurité, l'efficacité, la stérilité et la qualité sont indiquées. Dans d'autres cas où les produits immunologiques dépendent de la Section Générale de la Pharmacopée sur les vaccins à usage vétérinaire, ces normes minimums doivent alors s'appliquer, et les autorités de contrôles peuvent souhaiter ajouter aux normes minimums, d'autres exigences individuelles. Ces normes peuvent inclure l'identité de la souche d'antigène ; l'absence d'agents fortuits, l'innocuité, l'absence de toxicité, la quantité d'antigène par dose, la sécurité, l'efficacité et la stérilité, et la fabrication dans un cadre d'assurance qualité (AQ) officiellement approuvé de bonnes pratiques de fabrication.

Tout adjuvant ou ingrédient pharmacologiquement actif utilisé dans la formulation doit aussi être conforme vis-à-vis des exigences requises y compris les résidus dans les espèces destinées à la production alimentaire.

La différenciation entre les animaux qui ont été vaccinés et les animaux qui ont soit récupérés d'une infection, soit qui ont contracté une infection sub-clinique post-vaccinale peut aussi être une question importante, comme c'est le cas pour la FA. Il a été démontré que la détection des anticorps dirigés contre des polyprotéines non structurales (PNS) telle que la 3ABC de la FA était une méthode sensible et spécifique pour distinguer l'infection de la vaccination. Cela repose sur des méthodes de fabrication où le composant PNS peut être réduit à un niveau qui n'induit pas de séro-conversion détectable après la vaccination, ce qui fait de la pureté du vaccin un point important.

STOCKAGE DES VACCINS/ANTIGÈNES DANS UNE BANQUE

Il est important que les endroits de stockage choisis pour conserver les vaccins/antigènes soient convenables dans le contexte des exigences nationales ou des normes internationalement acceptées de bonnes pratiques de fabrication. C'est habituellement le cas lorsqu'une banque est gérée dans une fabrique de vaccins « agréée » et inspectée régulièrement. Cependant, si la banque est localisée en dehors d'une installation donnée de

formulation de vaccins, alors les aspects réglementaires doivent être là encore de grande importance et les autorités de contrôle des maladies doivent rechercher des conseils auprès des autorités de réglementation appropriés sur les normes applicables.

Si la banque de vaccins est associée à un laboratoire, ou une autre installation, où des agents pathogènes sont manipulés, cela doit être totalement indépendant des installations de stockage de la banque, et le personnel de maintenance et de surveillance doit subir une période de quarantaine avant d'entrer dans la banque.

Le stockage approprié des antigènes /vaccins dans une réserve d'urgence sera très dépendant de la maladie contre laquelle ils sont dirigés. L'antigène peut être un virus chimiquement inactivé ou tué, comme par exemple ceux utilisés pour les vaccins contre la FA, ou cela peut être un vaccin atténué tel que ceux contre la fièvre catarrhale du mouton. Les antigènes eux-mêmes peuvent être concentrés et maintenus à une température ultra-basse, dans de l'azote liquide par exemple, ou une conservation sous froid sec où la basse température n'est pas nécessairement importante. Quelle que soit la méthode de conservation, il est crucial qu'ils soient maintenus de façons optimales et surveillés en routine pour avoir quelques assurances concernant leur efficacité en cas de besoin. Les responsables des banques de vaccins doivent donc s'assurer que les arrangements nécessaires sont en place pour surveiller leurs réserves sur une base systématique et pour inclure, lorsque cela est nécessaire et à des intervalles de temps appropriés, des contrôles pour assurer l'intégrité du composant antigénique ou l'efficacité acceptable du produit final. Par exemple, la température de stockage sur 24 h peut être enregistrée ainsi que l'inspection régulière des flacons contenant l'antigène pour leur résistance à l'écrasement ou aux fuites. Dans ce contexte, les responsables peuvent également réclamer des contrôles indépendants ou un degré de confiance plus grand dans le système de surveillance/vérification des procédures de contrôles du fabricant.

Le besoin de tester en routine les stocks pour leur stabilité est évident, et c'est pour cela que les réserves d'antigènes/vaccins doivent inclure un grand nombre de petits échantillons, représentatifs du grand stock, destinés à ces analyses et conservés dans les mêmes conditions.

Bien que cela ne concerne pas directement la mise en place, la conservation et le fonctionnement des banques de vaccins ou d'antigènes, les pays doivent néanmoins reconnaître l'importance d'un programme d'urgence pour s'assurer que le vaccin stocké soit distribué et administré de façon rapide et efficace quand de besoin. Ils doivent s'assurer que les installations nécessaires à la chaîne du froid sont disponibles, que les protocoles de vaccination sont définis à l'avance, que les équipes de vaccination sont établies et convenablement entraînées et que les documentations, équipements, réactifs et vêtements nécessaires sont conservés en nombre suffisant pour soutenir toute campagne de vaccination potentielle. En cela l'avantage des exercices et des simulations effectués ne doit pas être négligé.

Il serait judicieux pour les pays et territoires membres de prendre connaissance de la littérature publiée sur les avancées importantes qui sont faites sur des sujets liés à la technologie des banques de vaccins. Les recherches en cours conduisent à des améliorations des produits, équipements, fabrication et distribution et de fait à une utilisation plus efficace et plus pratique des Banques. Dans ce contexte, une étude récente a examiné les méthodes de prolongation de la conservation d'un vaccin complètement formulé par une nouvelle procédure de formulation (2).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BARNETT P.V., KEEL P., REID S., ARMSTRONG R.M., STATHAM R.J., VOYCE C., AGGARWAL N. & COX S.J. (2004). Evidence that high potency foot-and-mouth disease vaccine inhibits local virus replication and prevents the 'carrier' state in sheep. *Vaccine*, **22**, pp. 1221–1232.
2. BARNETT P.-V. & STATHAM R.-J. (2002). Stratified and cryogenically stored (SACS) vaccines, a new concept in emergency foot-and-mouth disease vaccine formulation and storage. *Vaccine*, **20**, pp. 2060–2064.
3. FORMAN A.J. & GARLAND A.J.M. (2002). Foot and mouth disease: the future of vaccine banks. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **21**, pp. 601–612.
4. RWEYEMAMU M.M., BLACK L., BOGE A., THORNE A.C. & TERRY G.M. (1984). The relationship between the 140S antigen dose in aqueous foot-and-mouth disease vaccines and the serum antibody response of cattle. *J. Biol. Standard.*, **12**, pp. 111–120.

*

* *

RÔLE DES AUTORITÉS OFFICIELLES DANS LA RÉGLEMENTATION INTERNATIONALE DES PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE VÉTÉRINAIRE

RÉSUMÉ

Le contrôle officiel des produits biologiques vétérinaires est dévolu à des organisations nationales et régionales qui diffèrent dans leur approche d'assurance qualité, d'innocuité et d'efficacité des produits. L'harmonisation internationale des réglementations des produits biologiques n'a commencé que bien après celle concernant les produits définis comme chimiques. Les premiers produits biologiques à usage vétérinaire n'ont pas été fabriqués et distribués avant la fin du XIX^e siècle. Ils étaient souvent produits dans des conditions peu évoluées, puis distribués ou vendus sans aucun contrôle si ce n'est celui du fabricant. Plus tard, chaque fabricant a développé ces propres normes. En Europe, ces normes étaient soumises au contrôle de l'état, dès 1895 pour certains produits de diagnostic (ex: mallein, tuberculine) ou de vaccination. Les conditions d'harmonisation internationale des normes ont progressivement évolué, en commençant par les tests comparatifs des produits utilisés par différents laboratoires européens. Ce n'est que dans la seconde partie du XX^e siècle que des lois nationales couvrant les produits biologiques vétérinaires ont été imposées. Celles-ci imposèrent que des techniques précisément décrites soient suivies avant que des produits biologiques à usage vétérinaire soient brevetés. Cela a été suivi d'efforts considérables pour harmoniser ces réglementations nationales, tout d'abord au niveau régional (notamment en Europe et en Amérique) puis à un niveau plus général, notamment par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) avec la publication de la première édition du Manuel des normes de l'OIE pour les épreuves de diagnostics et les vaccins en 1989.

L'harmonisation mondiale des normes de produits biologiques vétérinaires aidera les responsables des services vétérinaires qui doivent suivre les instructions données par le Code international de la santé animale de l'OIE, puisqu'elles s'appliquent à tous les produits biologiques destinés aux échanges internationaux. Ce code viendra également en aide aux producteurs de vaccins, qui ont souhaité une harmonisation mondiale des lois d'enregistrement afin de simplifier et faciliter la commercialisation de leurs produits. Cela présentera également un intérêt évident pour les éleveurs et les consommateurs, qui bénéficieront du fait que la sécurité et l'efficacité des produits qu'ils utilisent seront assurées d'un haut niveau d'uniformisation.

Les différentes sections de ce chapitre vont reprendre et comparer les réglementations de régions du Monde qui ont effectué le plus de progrès dans un domaine donné et décriront les essais actuels d'harmonisation de ces réglementations au niveau international.

Note : Dans ce chapitre, le terme « produits vétérinaires » s'appliquera aussi bien aux vaccins et antisérums à usage vétérinaire qu'aux préparations pour diagnostic in vivo.

A. RÉGLEMENTATION DES PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE VÉTÉRINAIRE : SITUATION ACTUELLE

1. Au Japon

1.1. Introduction

Les produits thérapeutiques destinés exclusivement aux animaux, y compris les produits biologiques vétérinaires, relèvent de la compétence du ministère de l'Agriculture, des Forêts et de la Pêche. Leur qualité, leur efficacité et leur innocuité est stipulée dans le document intitulé « *Pharmaceutical Affairs Law* » (1). Depuis 1972, l'enregistrement des procédures a été développé dans le but de rationaliser l'examen des procédures et de faciliter l'obtention d'agrément. Ces procédures sont stipulées dans le « *Pharmaceutical Affairs Law* » ainsi que d'autres normes apparentées. En conséquence, une procédure d'examen rapide et simple a été obtenue en favorisant l'assurance de la qualité, de l'innocuité et de l'efficacité. La Commission de Sécurité Alimentaire a été établie au Ministère du Gouvernement du Japon, en juillet 2003. Dans le cas d'un examen pour un agrément, un ré-examen et une ré-évaluation, tous les vaccins vétérinaires, excepté les produits destinés aux chats et aux chiens, doivent satisfaire les principes de base de la sécurité sanitaire de la Commission de sécurité alimentaire.

1.2. Réglementation de l'agrément et de l'assurance qualité des produits vétérinaires biologiques

a) Demande d'agrément et d'autorisation

Toute personne ayant l'intention de mettre sur le marché des produits vétérinaires biologiques doit obtenir auprès du ministère de l'Agriculture, des Forêts et de la Pêche, une licence de détention et une autorisation en vue de la mise sur le marché pour chacun des produits. La demande pour l'autorisation de mise sur le marché doit être soumise avec les documents annexes désignés, tels que ceux des études cliniques. Concernant ce dernier point, les études d'innocuité et les études cliniques sur les espèces animales cibles doivent être effectuées en accord avec les bonnes pratiques de laboratoires (BPL) et les bonnes pratiques cliniques (BPC). L'autorisation de détention en vue de la vente doit être en accord avec les bonnes pratiques de qualité (BPQ) et les bonnes pratiques de vigilance (BPV).

L'autorisation de fabrication de produits vétérinaires biologiques est délivrée par le ministère de l'Agriculture, des Forêts et de la Pêche et elle doit être renouvelée tous les 5 ans. La conformité aux bonnes pratiques de fabrications (BPF) est stipulée comme étant l'une des conditions pour l'obtention ou le renouvellement d'une licence de fabrication.

b) Essais nationaux

Après avoir reçu l'autorisation, chaque lot de produit vétérinaire biologiques doit être examiné par le laboratoire national en charge des essais vétérinaires en accord avec les procédures normalisées d'essai pour les produits biologiques vétérinaires (3, 9). Un détenteur d'une autorisation de mise sur le marché doit se référer aux essais nationaux. Chaque produit destiné au marché doit être accompagné d'un tampon d'identification officiel servant de sceau sur l'emballage ou le récipient.

c) Ré-examen ou ré-évaluation

Le ré-examen est effectué sur des produits vétérinaires biologiques nouvellement approuvés. Habituellement, une évaluation des vaccins vétérinaires sur le terrain est conduite sur une période de 6 ans après l'agrément initial des vaccins. Pendant cette étude, l'efficacité et l'innocuité sont ré-examinées.

La ré-évaluation est effectuée sur commande du ministère de l'Agriculture, des Forêts et de la Pêche pour des produits approuvés et disponibles sur le marché. Cela peut survenir lorsqu'un produit biologique vétérinaire est suspecté de ne plus être conforme aux dernières normes concernant les produits biologiques vétérinaires.

d) Conditions minimales pour les produits vétérinaires biologiques

Les examens donnent des informations sur le suivi des procédés de fabrication et la qualité des produits : méthodes de fabrication, propriétés des souches utilisées pour la fabrication, procédures de contrôle de la qualité, méthodes de stockage et durée de conservation, en accord avec les normes données dans le « *Minimum Requirement of Veterinary Biological Products* » (2). Tout produit qui n'est pas conforme à ces normes de produits ne peut pas être fabriqué, importé ou commercialisé.

e) Cas de rejet d'agrément

Lorsque la qualité d'un produit biologique vétérinaire soumis pour agrément est considérée comme non satisfaisante, ou lorsque ces effets indésirables sont prononcés par rapport aux indications, le produit est jugé comme étant de faible valeur et l'approbation est refusée.

f) Annulation d'autorisations

Au moment de l'octroi de l'autorisation de mise sur le marché, la qualité, l'innocuité et l'efficacité du produit sont examinées attentivement en référence aux dernières technologies disponibles. Cependant, si de nouvelles données scientifiques obtenues depuis l'octroi de l'agrément indiquent qu'un risque pour la santé pourrait être associé au produit, alors une ré-examen et une ré-évaluation sont effectuées et un ordre d'« annulation d'autorisation » peut être formulé.

1.3. Procédure d'autorisation de mise sur le marché

Lorsqu'une personne envisage de commercialiser des produits biologiques vétérinaires, une demande d'autorisation pour la mise sur le marché du médicament vétérinaire doit être soumise à la personne officielle en charge des produits biologiques vétérinaires au Département d'hygiène animale de chaque Préfecture. Si le dossier est satisfaisant, la candidature pour l'autorisation de mise sur le marché, avec les documents annexes, est soumise au Secrétariat du Ministère de l'Agriculture, de la Forêt et de la Pêche. À ce niveau, un audit peut être effectué si cela est nécessaire. La candidature est alors discutée au niveau du Conseil des affaires pharmaceutiques et de la Sécurité sanitaire des aliments, et si aucun problèmes n'est trouvé, un avis d'autorisation de mise sur le marché du produit vétérinaire est envoyé au solliciteur.

2. Au sein de l'Union Européenne

2.1. Introduction

La législation pharmaceutique de l'Union Européenne (UE), qui a évolué sur une période de 30 années, couvre à la fois les produits médicaux à usage humain ou vétérinaire. L'harmonisation des obligations légales dans le domaine des médicaments vétérinaires a commencé en 1981 avec l'adoption des directives 81/851/CEE et 81/852/CEE, posant les obligations communes pour les autorisations de production et de commercialisation et basées sur l'évaluation de la qualité, de l'innocuité et de l'efficacité du produit. Ces directives, et la législation pharmaceutique vétérinaire et humaine ultérieure, ont été confortées dans la Directive 2001/82/CE et 2001/83/CE respectivement pour les produits vétérinaires et humains. Une série de directives détaillées furent d'abord publiées en 1994 et intitulées « *Rules Governing Medicinal Products in the EU* » (7). Depuis cette date, les directives ont été ré-actualisées et décrivent en détail les bases légales pour obtenir les autorisations de commercialisation, pour rédiger les dossiers et comment ils seront évalués. Ces règles servent de publications de référence extrêmement utiles pour toute autorité mettant en place un système d'autorisation de produits vétérinaires. Les règles ont été formellement adoptées et appliquées spécifiquement pour les produits biologiques vétérinaires depuis 1993. D'autres mesures supplémentaires ont été prises pour poursuivre l'harmonisation des procédures et des critères d'évaluation des produits vétérinaires thérapeutiques, telles que le cadre des obligations et les directives d'interprétation de leur évaluation, principes et directives des GMP, et une procédure communautaire pour l'évaluation des produits de haute technologie. Toutefois, l'octroi des autorisations demeurait au niveau national. En conséquence, bien que les candidatures étaient évaluées sur la base de ces critères et procédures harmonisés, et dans certains cas simultanément par les autorités des Etats Membres, des différences subsistaient dans les décisions au niveau des Etats Membres sur des produits particuliers. C'est pourquoi en 1990 la Commission a proposé un nouveau système d'autorisation de mise sur le marché des produits thérapeutiques, qui a été adopté par le conseil des ministres en 1993 et entré en application le 1^{er} Janvier 1995.

L'une des premières conséquences fut la création de l'Agence Européenne d'Évaluation des Produits Thérapeutiques (EMA, *European Medicines Evaluation Agency*) à Londres, Royaume-Uni.

Une nouvelle législation pour les produits vétérinaires (le règlement 726/2004 et la directive 2004/28/CE) a été publiée en mai 2004. Cette législation est entrée en vigueur pour la majeure partie en 2005 et a entraîné un certain nombre de changements visant à améliorer la santé publique et la santé animale, ainsi que la protection de l'environnement, par le renforcement des conditions et des contrôles. La Directive 2001/82/EC avait déjà stipulé que les autorités compétentes ne pouvaient pas délivrer d'autorisation de mise sur le marché (AMM) sans avoir conduit auparavant une analyse risque-avantage. Un document dans le dossier d'AMM doit « démontrer que les avantages liés à l'efficacité l'emportent sur les risques potentiels ». Toutefois, la relation entre avantages et risques n'était pas défini dans la Directive. La nouvelle Directive donne la définition de « l'équilibre entre les

risques et les avantages » : une évaluation des effets bénéfiques thérapeutiques du médicament vétérinaire en relation avec les risques.

Les risques concernent :

- l'animal ;
- l'utilisateur du médicament ;
- le consommateur qui pourrait être amené à ingérer des aliments contenant des résidus du médicament ;
- l'environnement.

Après révision de la Directive, si un médicament n'est pas disponible pendant 3 années de suite, son AMM est retirée. Avant la révision l'AMM était renouvelée tous les 5 ans. Aujourd'hui, un seul renouvellement est nécessaire. La pharmacovigilance est renforcée.

Le Titre IV du Règlement 726/2004 qui traite des responsabilités et de la structure administrative de l'Agence européenne est entrée en vigueur en avril 2004 afin de faire face à l'élargissement de l'Union Européenne.

2.2. Le rôle de l'Agence Européenne d'Évaluation des Médicaments

En 1995, un nouveau système européen est entré en vigueur concernant l'autorisation des produits thérapeutiques. Après 10 ans de coopération entre les autorités nationales de déclaration au niveau de l'UE et 4 ans de négociations, le conseil de l'UE a adopté en juin 1993, 3 directives et une réglementation qui constituent la base légale du système (5).

L'EMA a été établie par le Règlement du Conseil 2309/93/CEE du 22 juillet 1993 (JO No. L214, 24.8.1993), et Londres (Royaume-Uni) a été choisi comme siège par décision des chefs d'états et de gouvernements le 29 octobre 1993. Cette agence émet des avis et, en dehors du personnel administratif et du comité de direction, elle est constituée de 2 comités scientifiques, le CHMP (*Committee for Human Medicinal Products*) en charge des produits thérapeutiques à usage humain et le CVMP (*Committee for Veterinary Medicinal Products*) en charge des produits thérapeutiques à usage vétérinaire.

Le CVMP est responsable de l'évaluation des demandes d'autorisation de mise sur le marché de produits dérivés des biotechnologies, des augmentations de productivité, de nouvelles entités chimiques et autres nouveaux produits d'innovation. De plus, le CVMP émet des recommandations concernant les Limites résiduelles maximales (*MLRs, Maximum Residue Limits*) pour les substances utilisées dans les produits alimentaires animaux. Pour soutenir ses activités, le CVMP s'appuie sur un ensemble d'experts mis à disposition de l'agence par les États Membres de l'UE. Ces experts peuvent participer à n'importe quelle session de travail du CVMP. Parmi les sessions de travail, la session Immunologie (CVMP/IWP, *Immunologicals Working Party*) conseille le CVMP sur des questions générales de réglementation telles que l'élaboration et la ré-actualisation de lignes directrices sur les produits immunologiques. Une session de travail d'avis scientifique prévue dans le règlement 726/2004 a été créée et a pour but de conseiller les demandeurs durant la phase de développement d'un produit thérapeutique vétérinaire. Les lignes directrices pour les essais de produits thérapeutiques vétérinaires sont présentées dans « *The Rules Governing Medicinal Products in the EU* », dont la dernière publication date de 1999 (7). Les nouvelles lignes directrices, et les révisions des anciennes, ne sont plus disponibles sous forme imprimée mais elles sont accessibles sur le site web de l'EMA à l'adresse www.ema.eu.int et/ou sur le site web de la DG Entreprise à l'adresse pharmacos.eudra.org.

2.3. Procédures européennes actuelles pour l'autorisation de mise sur le marché

Quatre nouvelles procédures de déclaration pour les produits thérapeutiques humains et vétérinaires sont maintenant disponibles avec la nouvelle réglementation.

1. La procédure centralisée permet l'obtention d'une seule autorisation de mise sur le marché qui s'applique à tous les États Membres. Elle concerne les produits de haute technologie définis dans l'annexe du règlement. Elle est facultative pour les médicaments innovants. Cette procédure a été étendue aux vaccins vétérinaires contre les maladies animales qui font l'objet de mesures de prophylaxie communautaires.
2. La procédure nationale permet l'obtention d'une AMM pour un médicament dans un seul pays ou dans un autre pays qui sera à l'origine d'une procédure de reconnaissance mutuelle.
3. La procédure de reconnaissance mutuelle : la demande d'autorisation d'un produit peut n'être obtenue que dans un unique État Membre (« État Membre de Référence ») au moyen d'une procédure nationale. Les mêmes règles que celles gouvernant les produits thérapeutiques dans l'Union Européenne s'appliquent. Suite à l'approbation dans l'État Membre de Référence, la demande peut être faite, si cela est souhaité, à d'autres États Membres « concernés » pour des autorisations identiques afin d'obtenir un accord sur les bases de la « reconnaissance mutuelle ».

4. La nouvelle procédure décentralisée combine la procédure nationale et la procédure de la reconnaissance mutuelle, c'est-à-dire qu'elle est basée sur le principe de la reconnaissance mutuelle des autorisations nationales. Au début de cette procédure, tous les États Membres sont associés puis la procédure de reconnaissance mutuelle suit immédiatement.

La modification la plus importante est l'aspect obligatoire de l'*arbitrage* en cas de désaccord entre les États Membres au cours des procédures décentralisées ou de reconnaissance mutuelle. Si un État Membre considère qu'un risque sérieux existe pour la santé publique, une procédure de pré-arbitrage doit être menée. Dans une telle situation un demandeur d'AMM ne peut pas retirer sa demande. L'arbitrage permet qu'une décision soit prise sur la possibilité d'un risque sérieux présenté par le médicament. À la fin, la décision (d'accorder ou non l'AMM) est harmonisée sur l'ensemble de la communauté.

2.4. L'autorisation de production et le contrôle des lots commercialisés

En accord avec la directive 2001/82/CE, une autorisation est également nécessaire pour la production des produits vétérinaires thérapeutiques, y compris les produits immunologiques. Cette directive prévoit des inspections régulières et stipule que la production doit être supervisée par une « personne qualifiée », qui certifie que chaque lot est conforme aux spécifications approuvées pour le produit. Concernant la mise en œuvre de ces contrôles, la Commission a adopté la directive 91/412/CEE liée au principe et aux instructions des BPF, et a publié un guide détaillé sur les BPF développées par un groupe d'inspecteurs pharmaceutiques des États Membres.

La nouvelle directive établit aussi les BPF pour les principes actifs des médicaments. Cette disposition est renforcée par la disposition qui autorise les États Membres à pratiquer des inspections sur les principes actifs destinés aux fabricants des médicaments vétérinaires.

Les fabricants doivent impérativement avoir des personnes qualifiées à leur disposition afin de certifier que le lot de produit a été fabriqué et contrôlé en accord avec les conditions d'autorisation de fabrication. C'est une nécessité de base de la législation pharmaceutique. Dans le cas de lots importés de pays tiers, chaque lot doit subir une analyse complète qualitative et quantitative au minimum des composés actifs, dans le premier État Membre d'importation de l'UE, sous le contrôle d'une personne qualifiée. Aussitôt que ce contrôle a été effectué par une personne qualifiée, le lot peut circuler au sein de l'UE sans contrôle supplémentaire. Dans le cas particulier des produits vétérinaires immunologiques, une étape supplémentaire a été ajoutée. La directive 90/677/CEE permet aux États Membres, qui le considèrent nécessaire, de soumettre des échantillons de chaque lot de production en masse et/ou de produit fini afin qu'il soit examiné par un laboratoire de contrôle avant que le lot ne soit mis sur le marché. Cette mise sur le marché officielle d'un lot n'annule pas la nécessité de contrôle du lot par une personne qualifiée. Exception faite de certaines circonstances justifiées, la mise sur le marché d'un lot par un laboratoire de contrôle national doit être reconnue sans répétition par un autre État Membre. Afin d'assurer un fonctionnement aisé de cette disposition, une procédure administrative d'échange d'informations a été convenue entre les autorités compétentes. Bien que tous les États Membres n'imposent pas une mise sur le marché officielle des lots de produits vétérinaires immunologiques, ils ont tous souhaité être impliqués dans cette procédure d'échange d'informations. Des discussions en cours devraient permettre d'harmoniser le système de mise sur le marché des lots dans tous les États Membres de l'UE.

2.5. Le rôle de la pharmacopée européenne

Les 30 dernières années ont vu de profonds changements au niveau de l'organisation et de la réglementation des produits thérapeutiques dans les pays Européens (4). Il y a 30 ans, chaque pays avait ses propres réglementations, et entre-eux, les pays européens possédaient les deux tiers de la pharmacopée mondiale. La convention de la pharmacopée européenne a maintenant été signée par 36 États Membres¹ : en outre, 17 pays européens et non-européens², ainsi que l'organisation mondiale de la santé (OMS) ont un statut d'observateur. Des relations étroites sont entretenues avec les autorités délivrant les autorisations du secteur économique européen, où l'intégration se développe à travers des contacts avec l'EMA et l'exécution des directives communes ainsi que les recommandations sur l'utilisation des produits thérapeutiques humains et vétérinaires. En 1990, la pharmacopée européenne a co-fondée avec la pharmacopée japonaise et la pharmacopée des États-Unis, le groupe de discussion de pharmacopée (GDP). Ce groupe travaille de façon assidue pour une

1 Allemagne, Autriche, Belgique, Bosnie Herzégovine, Bulgarie, Croatie, Chypre, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Islande, Irlande, Italie, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Pologne, Portugal, République de Macédoine, République Slovaque, République Tchèque, Roumanie, Royaume Uni, Serbie et Monténégro, Slovénie, Suède, Suisse, Turquie et Union Européenne ; les États Membres doivent appliquer les normes de la Pharmacopée Européenne.

2 Albanie, Algérie, Australie, Brésil, Canada, États-Unis d'Amérique, Géorgie, Israël, Madagascar, Malaisie, Maroc, République populaire de Chine, Sénégal, Syrie, Tunisie, Ukraine ; les États observateurs n'ont pas à appliquer les normes de la Pharmacopée Européenne. Certains le font sur une base volontaire.

harmonisation au niveau mondial, et il participe au programme de la conférence internationale d'harmonisation (ICH, *International Conference on Harmonisation*) des obligations techniques pour l'inscription des produits pharmaceutiques à usage humain. Un programme parallèle pour les produits de médecine vétérinaire, la Conférence internationale de coopération d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des produits de médecine vétérinaire (VICH), a récemment recentré son attention afin d'harmoniser les exigences pour certains types de tests de routine effectués sur des agents étrangers (voir le Paragraphe C.4, ci-dessous). Parce que la Directive 2001/82/CE impose la conformité des monographies, la Pharmacopée européenne définit les normes minimales acceptables pour que les produits soient autorisés au sein de l'Union Européenne. Ceci implique que les produits doivent satisfaire à la monographie spécifique dont ils relèvent lorsqu'elle existe, ou aux monographies générales si la spécifique n'existe pas.

La Pharmacopée européenne contient également un secteur intitulé le « Département européen pour la qualité des médicaments » (DEQM,). Il crée, maintient et distribue les réactifs étalons internationaux référencés dans les monographies de la pharmacopée européenne. À l'heure actuelle il existe quelques étalons de produits biologiques vétérinaires, mais le DEQM devient plus actif dans ce domaine et il est prévu que plusieurs autres seront disponibles dans un futur proche.

3. Aux États-Unis d'Amérique

3.1. Introduction

Aux États-Unis, les produits vétérinaires et les produits biologiques vétérinaires sont définis comme étant tous les virus, sérums, toxines (à l'exception des substances qui sont toxiques de manière sélective vis-à-vis de micro-organismes, comme par exemple les antibiotiques), ou des produits analogues quelles que soient leurs étapes de production, d'envoi, de distribution ou de vente, et qui sont destinés à être utilisés dans des traitements (prévention, diagnostic, gestion ou traitement) de maladies animales et qui agissent tout d'abord par une stimulation directe, un complément, une amélioration ou une modulation du système immunitaire ou de la réponse immunitaire. Le terme de produits biologiques inclut, tout en ne s'y limitant pas, les vaccins, les bactéries, les allergènes, les anticorps, les antitoxines, les toxoïdes, les immunostimulants, certaines cytokines, des composants d'organismes vivants antigéniques ou immunisants et des composants diagnostiques qui sont d'origine naturelle ou synthétique, dérivés de la synthèse ou de l'altération de substances variables ou de composants de substances tels que les micro-organismes, les gènes ou séquences génétiques, les carbohydrates, les protéines, les antigènes, les allergènes ou les anticorps.

3.2. Bases légales

La loi de 1913 sur les Virus/Sérum/Toxines (la « loi VST »), telle qu'elle a été amendée (21 U.S.C. sections 151 à 159), prévoit l'autorité légale pour les produits biologiques et immunologiques à usage vétérinaire aux États-Unis. Le programme de contrôle permettant de mettre en œuvre les obligations de la loi VST est administré par le Centre des Produits Biologiques Vétérinaires (*Center for Veterinary Biologics, CVB*), le service de l'inspection de la santé animale et végétale (*Animal and Plant Health Inspection Service, APHIS*) du ministère de l'agriculture des États-Unis (*United States Department of Agriculture, USDA*). La réglementation administrative, dûment promulguée et ayant effet de loi, est publiée dans le code de la réglementation fédérale, Parties 101 à 118, Titre 9 (6). De plus, l'APHIS a publié un programme de conseils dans les notes du CVB, le Mémoire des services vétérinaires, Réflexions sur l'autorisation de manière générale des produits biologiques vétérinaires, et le Manuel du programme des produits biologiques vétérinaires. Tous ces documents et informations peuvent être consultés sur le site web du CVB à l'adresse suivante : www.aphis.usda.gov/vs/cvb.

La loi VST exige que les produits régis par la loi et qui entrent dans les réseaux de distribution ne soient ni inutiles, ni contaminés, ni dangereux ou nocifs. Le schéma de réglementation mettant en place ces normes est réalisé de manière à exiger aux fabricants de ces produits qu'ils demandent des autorisations préalablement à la commercialisation, et de placer certaines responsabilités sur ces demandeurs. Il est, par exemple, demandé aux fabricants de démontrer par le biais de certaines informations, données expérimentales et résultats de tests, que leurs produits sont « purs, inoffensifs, actifs et efficaces ». Le programme de l'APHIS pour les produits immunologiques et biologiques à usage vétérinaire régit la production et la mise sur le marché des produits à travers un système de permis, d'inspections, de tests et de surveillance après commercialisation qui assure que les normes légales et réglementaires soient satisfaites.

3.3. Autorisation et inspection initiales

Toute personne ou entreprise cherchant à produire aux États-Unis (USA) un produit immunologique ou biologique à usage vétérinaire doit obtenir de l'APHIS une autorisation de fabriquer dans une installation spécifique (Autorisation d'Etablissement), et une autorisation de fabrication pour chaque produit particulier (Autorisation de

Produit). Ces obligations d'autorisations sont applicables que le produit soit réalisé pour le marché des USA ou pour l'étranger. Habituellement, la demande d'autorisation concernant l'installation de production s'effectue en même temps que la demande d'autorisation du premier produit. Lorsque les autorisations d'installation et de fabrication d'un produit sont obtenues, une entreprise souhaitant produire et vendre de nouveaux produits n'aura besoin que d'autorisations additionnelles de production. Une personne ou une entreprise étrangère souhaitant commercialiser ses produits sur le marché des USA doit également demander une autorisation de mise sur le marché. Dans le cas de produits importés, cependant, on parlera de « permis » plutôt que d'« autorisation ».

Pour obtenir une autorisation d'installation, le demandeur doit soumettre pour approbation le plan de l'installation (c'est-à-dire les plans architecturaux des bâtiments) accompagné des légendes. L'APHIS examine ces plans et légendes afin de s'assurer que les installations sont conformes avec la mise en œuvre des GMP. Si le demandeur effectue ultérieurement des modifications physiques ou opérationnelles de l'installation, les plans et les légendes doivent être soumis immédiatement.

Pour obtenir une autorisation de production, le demandeur doit établir la pureté et l'identité de tous les stocks de semences souches et cellules souches qui seront utilisées pour la fabrication du produit, et doit soumettre pour approbation un schéma directeur détaillé de la production. Le schéma directeur de la production inclut non seulement les détails de la méthode de fabrication du produit, mais aussi une description des procédures de collecte des échantillons et de mise sur le marché des lots. Le demandeur doit également donner des informations concernant les compétences professionnelles et techniques du personnel de l'entreprise, et doit identifier un individu qualifié (appelé selon la réglementation américaine le « lien avec l'administration ») qui agit en tant que contact officiel avec le CVB pendant la procédure d'autorisation, et qui est par la suite responsable de la soumission du compte-rendu des tests de l'entreprise conjointement avec la mise sur le marché du produit. Le demandeur a l'obligation de soumettre les résultats des tests qui démontrent que le produit fabriqué conformément au schéma directeur est pur, inoffensif, actif et efficace. Le demandeur doit soumettre au laboratoire du CVB des échantillons de 3 lots successifs du produit afin de confirmer les résultats des tests du demandeur.

Enfin, avant de recevoir les autorisations d'installation et de production, les locaux du demandeur sont soumis à une inspection détaillée par les inspecteurs de l'APHIS. L'inspection garantit que l'installation est opérationnelle et conforme avec les GMP en confirmant que l'établissement est configuré tel que les plans et légendes ont été approuvés, que la chaîne de production est installée et fonctionne selon les plans de production approuvés, et que les archives sont conservées et gardées de façon adaptée pour chaque étape de la production. L'inspection confirme également que le demandeur respecte les procédures correspondant aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL, *Good Laboratory Practices*, GLP), que le programme de contrôle des produits en cours de production et les produits finis sont conduits correctement et décrits de manière appropriée, que l'échantillonnage est effectué correctement, que des procédures adaptées pour déterminer et décrire la mise sur le marché du produit sont mises en place.

3.4. Inspections après autorisation

Lorsqu'une entreprise a reçu les autorisations d'installation et de production, l'APHIS va régulièrement inspecter minutieusement les installations afin de s'assurer que le détenteur de l'autorisation continue de diriger l'établissement en accord avec les réglementations du programme et tel que cela a été présenté lors de la demande d'autorisation. Les inspections après autorisation sont conduites périodiquement sans être annoncées. Si le détenteur de l'autorisation propose des modifications significatives de l'installation ou de la méthode de production d'un produit autorisé, l'APHIS se réserve le droit de conduire une inspection spéciale avant d'approuver les changements.

3.5. Essais

Chaque détenteur d'autorisation est responsable de la réalisation minutieuse de tests concernant toutes les procédures de production et de chaque série (ou lot) de tous les produits avant leur mise sur le marché. Le type et le nombre d'essais nécessaires dépendent de chaque produit, mais ils sont déterminés et approuvés par l'autorité réglementaire avant l'obtention de l'autorisation de production. Un individu qualifié, employé par le détenteur de l'autorisation (« le lien avec l'administration ») est responsable de la sélection d'échantillons devant être testés, de contrôler le programme d'essais, et de certifier les résultats des essais auprès de l'autorité réglementaire.

En même temps que l'entreprise sélectionne des échantillons pour ces propres essais en interne, elle sélectionne également des échantillons qui seront soumis aux laboratoires du CVB. Le CVB se garde le droit de conduire des tests de confirmations. Si c'est le cas, le CVB sélectionne un pourcentage d'échantillons soumis ou de tests de confirmation, afin de vérifier la justesse et le niveau des essais du fabricant des tests. Le test est effectué avant l'autorisation de mise sur le marché pour chaque série. Selon la réglementation, le CVB doit mettre en place les essais sur les échantillons sélectionnés dans les 14 jours suivants leur réception ; ordinairement, les échantillons

sont mis à l'essai avant cette limite de 14 jours si bien que les essais de production par l'entreprise et le programme d'essais du CVB sont en réalité effectués en même temps.

Quand l'entreprise reçoit les résultats de ses propres tests, le « lien avec l'administration » soumet ces résultats à l'autorité réglementaire accompagnés du formulaire de sortie de lot, initiant la procédure de mise sur le marché. Si le lot n'a pas été sélectionné pour le programme d'efficacité des essais, ou s'il a été sélectionné mais que les tests du CVB confirment les résultats des tests de l'entreprise, alors le formulaire de mise sur le marché est contresigné par l'autorité réglementaire achevant ainsi la procédure de mise sur le marché. Si les tests de l'entreprise ou les tests d'efficacité des essais indiquent que le lot pourrait être non satisfaisant, alors le lot ne peut pas être mis sur le marché.

Si le détenteur de l'autorisation fait une proposition de modification de son installation ou de son mode opératoire qui pourrait affecter la pureté, l'innocuité, l'activité et l'efficacité du produit, l'autorité réglementaire peut demander au détenteur de l'autorisation de présenter des résultats démontrant la pureté, l'innocuité, l'activité et l'efficacité du produit ainsi que de soumettre des échantillons du produit aux laboratoires du CVB pour confirmer les tests.

3.6. Surveillance après commercialisation

Le CVB conduit un programme de surveillance après commercialisation afin de surveiller la performance des produits sur le marché. Avec ce programme, le CVB est habituellement informé de tous les problèmes liés à la qualité des produits par les rapports ou plaintes des consommateurs, bien que la réglementation du programme oblige le détenteur de l'autorisation à informer le CVB de tous problèmes identifiés concernant la pureté, l'innocuité ou l'activité du produit. Le CVB a l'autorité légale d'intervenir sur les lieux de commercialisation où surviennent des problèmes sérieux concernant la pureté, l'innocuité, l'activité et l'efficacité du produit.

B. COMPARAISON DES RÉGLEMENTATIONS DE L'UNION EUROPÉENNE ET DES ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Les produits vétérinaires biologiques doivent satisfaire des critères de base, quelle que soit l'Agence Légale supervisant leur production. Ces critères incluent :

- L'innocuité : le produit doit être inoffensif dans l'espèce cible et, s'il est vivant, dans les espèces exposées aux organismes excrétés ;
- L'efficacité : le produit doit être efficace conformément aux indications portées sur l'étiquette ;
- La qualité : cela inclut la pureté, l'activité et la consistance ;
- La pureté : le produit doit être exempt d'agents contaminants ;
- L'activité : chaque lot de produit doit être formulé, et testé, pour assurer l'efficacité et la reproductibilité de l'activité comme démontré dans les données de déclaration.

Bien que, sur des bases globales, les agences et la réglementation diffèrent, elles s'efforcent d'assurer que les produits offerts au consommateur final soient conformes à ces normes de base.

L'Union Européenne (UE) utilise un système qui est une combinaison de GMP, incluant des procédés validés et des spécifications de matériels, avec des méthodes de production qui assurent la qualité du produit final. Les contrôles en cours de production et sur les lots constituent des garanties supplémentaires de la qualité des IVMPs. Les tests d'innocuité sont effectués sous BPL et l'ensemble des tests d'efficacité sous GCP. Les États-Unis définissent des procédés de fabrication acceptables dans les Plans de Production et la description détaillée des installations (plans d'installation et légendes) et s'appuient sur des inspections et la confirmation de tests pour atteindre le même but. Bien que différents, les deux systèmes sont conçus pour ne permettre la mise sur le marché que de produits biologiques purs, inoffensifs, actifs et efficaces.

En plus des données fournies par le demandeur, les rapports des experts doivent être inclus dans les dossiers de demande de commercialisation dans l'UE. Chaque partie principale du dossier de l'UE, incluant l'analytique, l'innocuité et l'efficacité, doit être examinée par un expert indépendant. L'appréciation de l'expert est incluse dans le dossier d'autorisation de commercialisation. Aucun système, tel que celui-ci d'analyse par un tiers, n'existe dans la réglementation de l'USDA excepté pour certains produits issus des biotechnologies.

Il existe de nombreuses différences de procédure entre l'UE et les USA. L'harmonisation entre les deux systèmes doit être établie lorsque cela est possible, sur la reconnaissance d'équivalence pour les tests et les procédures qui sont effectués pour obtenir un vaccin et qui assurent la qualité, l'innocuité et l'efficacité du produit. Des accords de reconnaissance mutuelle concernant les produits vétérinaires biologiques ont été signés entre l'UE et l'Australie, et entre l'UE et la Nouvelle-Zélande. Ces accords sont maintenant en phase opérationnelle. La

progression sur ces accords de reconnaissance mutuelle entre l'UE et les USA, concernant les produits biologiques vétérinaires, prendra probablement plus de temps pour se mettre en place.

C. LE RÔLE DES ORGANISATIONS INTERNATIONALES

La plupart des nations ont une variété de lois officielles qui réglementent la vente et l'utilisation de produits biologiques vétérinaires. Presque toutes ces lois stipulent les « obligations minimales » pour la qualité, l'innocuité et l'efficacité des produits biologiques vétérinaires (principalement des vaccins), qui doivent être testées dans des laboratoires indépendants, généralement sous le contrôle de l'Etat. Ces lois et ces tests peuvent différer d'un pays à un autre, et ils impliquent des coûts et des limitations pour les producteurs, les utilisateurs et les testeurs.

Beaucoup des vaccins décrits dans ce *Manuel terrestre* sont produits et/ou utilisés dans des pays qui n'appliquent pas en ce moment le régime d'autorisation et de test de manière aussi rigoureuse que celui décrit dans ce chapitre. Néanmoins, il est utile d'être informé des réglementations appliquées dans les différentes régions et, de ce fait, des tests et inspections qui ont probablement été effectués là-bas sur les produits biologiques vétérinaires.

L'idée d'harmoniser ces tests pour simplifier et réduire les coûts à un niveau régional, ou même une échelle mondiale, n'est pas nouvelle, et beaucoup de choses ont été faites dans ce sens depuis les 20 dernières années. Le but de cette partie est d'analyser la situation actuelle en décrivant le rôle des organisations internationales dans la réglementation des vaccins vétérinaires.

Dans cette partie le terme d'« organisations internationales » fait référence à celles concernées par la santé animale à un niveau mondial (l'OIE [Organisation mondiale de la santé animale anciennement nommée l'Office international des épizooties], la FAO [*the Food and Agriculture Organisation of the United Nations*, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture], et l'OMS [Organisation mondiale de la santé]).

1. Le rôle de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE)

L'OIE a été fondée à Paris en 1924 comme organisation mondiale de la santé animale, et comprend 172 Pays membres en 2008. Les objectifs principaux de l'OIE sont : assurer la transparence de la situation de l'ensemble des maladies animales et des zoonoses, de collecter, d'analyser et de disséminer les informations scientifiques vétérinaires, d'apporter une expertise et d'encourager la solidarité internationale dans le contrôle des maladies animales, et dans le cadre de son mandat issu de l'Accord sur les Mesures Sanitaires et Phytosanitaires (Accord SPS) de l'Organisation mondiale du commerce (OMC), de sauvegarder le commerce mondial en publiant les normes de santé pour le commerce international des animaux et des produits animaliers, d'améliorer le cadre légal et les ressources des Services Vétérinaires nationaux et de donner une meilleure garantie de la sécurité des aliments à bases d'animaux et de promouvoir le bien-être des animaux par une approche scientifique (13).

Au sein de l'OIE, quatre Commissions Spécialisées existent : la Commission des normes sanitaires pour les animaux terrestres qui s'occupe du *Code sanitaire pour les animaux terrestres*, la Commission des normes biologiques, la Commission scientifique pour les maladies animales et la Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques (incluant les maladies des mollusques et des crustacés). De plus, il y a trois groupes de travail : le Groupe de travail pour les maladies des animaux sauvages, le Groupe de travail sur la sécurité sanitaire des aliments d'origine animale en phase de production et le Groupe de travail sur le bien-être animal.

Parmi les Commissions Spécialisées, celle qui est la plus étroitement liée avec la normalisation est la Commission des normes biologiques. Cette commission établit les normes pour les méthodes de diagnostic (incluant les protocoles de préparation) et pour les vaccins. Ses modalités de référence reflètent les obligations de la Commission à participer à la normalisation des produits biologiques, incluant les vaccins utilisés dans des buts prophylactiques. La Commission des normes biologiques est responsable de la préparation du *Manuel des épreuves de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE* (11), et l'organisation de Laboratoires de référence pour de nombreuses maladies contenues sur la liste de l'OIE.

Cependant, une normalisation complète des essais vaccinaux ne pourra être achevée que lorsque les normes nécessaires auront été créées. A travers la participation des Laboratoires de référence de l'OIE, on peut espérer atteindre les objectifs de normalisation et une large disponibilité des normes. Les fonctions et les responsabilités des experts dans plus de 170 Laboratoires de références de l'OIE incluent la mise à disposition d'un centre d'excellence dans une activité désignée ; la normalisation des méthodes ; la préparation, le stockage et la distribution d'anti-sérums, d'antigènes et autres réactifs normalisés.

Parmi les Centres collaborateurs de l'OIE, trois peuvent être impliqués à quelques étapes du contrôle et/ou de l'harmonisation des vaccins vétérinaires : le Centre collaborateur pour les médicaments vétérinaires de Fougères (France), le Centre collaborateur pour l'ELISA (méthodes immuno-enzymatiques) et pour les techniques

moléculaires dans le diagnostic de maladies animales de Vienne (Autriche), et le Centre collaborateur pour le diagnostic des maladies animales et pour l'évaluation des vaccins d'Ames (USA).

En 1994, à l'issue de discussions avec la Consultation technique internationale sur l'enregistrement des médicaments vétérinaires (ITCVDR, *International Technical Consultation on Veterinary Drug Registration*), l'OIE a mis en place un groupe de travail sur l'harmonisation des médicaments vétérinaires, qui a été la première étape vers la création du VICH (*International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products*, Coopération internationale d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des produits vétérinaires) (voir Section C.4. ci-dessous).

En Mai 2003, la Commission Internationale de l'OIE a adopté une résolution appelée Procédure de l'OIE pour la validation et la certification des épreuves de diagnostic (Méthodes de diagnostic) pour les maladies animales infectieuses. Cette résolution prévoit que le Directeur général de l'OIE établisse un registre de l'OIE pour les épreuves avec des niveaux spécifiés de validation. L'aptitude pour l'objectif doit être utilisée comme un critère de validation.

2. Le rôle de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)

La FAO, établie en 1945, est responsable du développement de l'agriculture et de la production des aliments. La « Division sur la Production et la Santé Animales » au sein du Département de l'Agriculture est concernée par le développement du bétail, et inclut le Service de Santé Animale dont le rôle principal est d'assister les Pays membres dans le contrôle des maladies animales, avec l'objectif d'améliorer la production de bétail en tant que composant intégral du développement social, économique et agricole. L'implication de la FAO dans les tests de produits biologiques vétérinaires se manifeste tout d'abord à travers son système d'assistance technique au Pays membres pour mettre en place et même exécuter des contrôles de qualité indépendants pour les vaccins et autres produits biologiques. Un exemple est illustré par l'assistance de la FAO auprès de l'UA (Union Africaine) dans la mise en place d'un système pour le test continental de vaccins vétérinaires, en particulier contre la peste bovine et la péripneumonie contagieuse bovine, par le Centre pan-africain de vaccinations vétérinaires (PANVAC). La FAO dirige également, à la demande des Pays membres, des initiatives soit pour l'assurance qualité des vaccins et autres produits biologiques ou des consultations d'experts sur ces sujets, soit la publication de manuels sur la production et les contrôles de la qualité des vaccins. De plus, deux services auxiliaires, peuvent être sollicités pour intervenir sur des questions concernant ces produits, à savoir le Codex Alimentarius et la Division des techniques nucléaires dans l'alimentation et l'agriculture. Ce dernier est dirigé conjointement par la FAO et l'Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA) basée à Vienne (Autriche). Elle a une Section de santé et production animales, qui assiste les services vétérinaires et les instituts de recherche dans les pays en développement pour établir des dosages radio-immunologiques (RIA, *radio-immunoassay*) et des techniques ELISA. Un plan d'assurance qualité est joint à cette activité. Ce plan d'assurance qualité prévoit que des laboratoires reçoivent des kits de diagnostic ELISA de la FAO/AIEA et doivent en routine surveiller les contrôles internes de qualité et tester périodiquement (1 ou 2 fois par an) un lot d'échantillons inconnus. Les résultats sont retournés à l'AIEA. L'objectif global est de fournir l'assurance à toutes les personnes concernées que les résultats ainsi obtenus par l'utilisation de kits de diagnostic normalisés et validés à un niveau international puissent être considérés comme fiables.

3. Le rôle de l'Organisation mondiale de la santé (OMS)

Actuellement l'OMS n'est pas directement impliquée dans l'élaboration de préparations de références internationales (par exemple antigènes ou anticorps) à usage vétérinaire uniquement, mais a développé et continue de garder à l'Institut national de normes et de contrôles biologiques, Potter's Bar (GB) quelques matériels liés à des maladies purement vétérinaires (par exemple des vaccins vivants contre la maladie de Newcastle, des sérums anti-peste porcine classique). L'OMS souhaite garder un rôle dans ce domaine particulier où les préparations de référence vétérinaire et les documents de conseils ont un intérêt direct pour la santé humaine (8, 10, 15, 16). Ceci implique les agents zoonotiques et potentiellement zoonotiques et les autres agents infectieux d'origine animale qui sont des contaminants potentiels de produits biologiques, qu'il s'agisse de vaccins produits en cultures cellulaires ou d'organes pour la xénotransplantation. À la réunion du Comité des experts sur la normalisation des produits biologiques en octobre 1998, une analyse des normes internationales actuellement retenues et des préparations de référence pour la médecine vétérinaire a été conduite et une liste des candidats pour un arrêt, un remplacement ou une révision a été proposée (8). Le Comité des experts a cependant décidé de différer l'action sur la préparation des matériels de référence vétérinaire en attendant une évaluation par l'OMS avec ses partenaires du domaine vétérinaire sur les besoins en produits biologiques variés. De plus, l'actualité de certains produits, spécialement des vaccins vétérinaires contre des zoonoses connues (par exemple la fièvre charbonneuse, la brucellose) adoptés et/ou révisés dans les années 60 et 70, a également besoin d'être évaluée.

Le format de la liste des obligations pour les substances biologiques publiée dans l'Appendice de chaque rapport du Comité des experts sur la normalisation des produits biologiques a été révisé en 1998 et devrait faciliter la récupération d'informations et devrait permettre d'atteindre l'objectif d'amélioration de la transparence.

4. Le rôle du VICH

4.1. Qu'est ce que le VICH ?

a) Courte description du VICH

Le VICH est un programme trilatéral (États-Unis d'Amérique – Japon – Union Européenne) dont l'objectif est d'harmoniser les exigences techniques pour l'enregistrement des produits vétérinaires. Son intitulé entier est la Coopération internationale pour l'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des produits vétérinaires. Le VICH démarra officiellement en avril 1996.

b) Genèse et historique

L'initiative de démarrer un processus d'harmonisation prit forme en 1983 lors de la première tenue de la Consultation technique internationale sur l'enregistrement des médicaments vétérinaires (ITCVDR, *International Technical Consultation on Veterinary Drug Registration*). Dès lors une série d'initiatives de gouvernements et d'industries se développèrent, aboutissant à la formation du VICH.

Le Codex Alimentarius forma un Comité sur les résidus des médicaments vétérinaires dans l'alimentation en 1985. La nécessité de normes pour l'enregistrement des produits vétérinaires fut adoptée en Europe en 1981.

La « *Food and Drug Administration* » des États-Unis et la Commission Européenne ont tenu de manière régulière des rencontres bilatérales durant ces dix dernières années pour discuter à propos de domaines d'intérêts communs. Cela a impliqué notamment l'échange mutuel de lignes directrices pour consultation.

La première Conférence internationale sur l'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des produits pharmaceutiques à usage humain (ICH, *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) se tint à Bruxelles en novembre 1991. Elle réunit des représentants des administrations chargées de l'enregistrement et de l'industrie, provenant des États-Unis, du Japon et de l'Union Européenne, dans le but d'aborder les exigences en matière de qualité, d'innocuité et d'efficacité dans ces trois régions.

Les réunions sur l'harmonisation des produits biologiques vétérinaires eurent lieu à Ploufragan, en France, en janvier 1992, à Arlington, aux États-Unis, en 1994 et à Singapour en 1995.

En Janvier 1993, le document de discussion GHOST (*Global harmonisation of standards*, Harmonisation globale des normes) fut publié par la FEDESA³. Il présentait un programme pour l'harmonisation des obligations lors de l'enregistrement des produits vétérinaires pharmaceutiques et biologiques.

À la suite de discussions pour l'ITCVDR ou dans le cadre de conférences à l'OIE, l'OIE mis en place un Groupe *ad hoc* sur l'harmonisation des produits pharmaceutiques à usage vétérinaires en 1994.

c) La création et la portée du VICH

Le travail préparatoire pour la création du VICH fut réalisé par le Groupe *ad hoc* de l'OIE précédemment cité. Entre 1994 et 1995, deux réunions eurent lieu durant lesquelles il fut discuté de la portée de l'harmonisation concernant le domaine vétérinaire, du nombre effectif des membres et des objectifs du VICH ainsi proposé.

Concernant les normes de sécurité alimentaire, il fut décidé que le VICH devrait compléter le travail déjà effectué par le Codex et le JEFCA⁴. Les sujets relatifs au GLP et au GMP, qui faisaient déjà l'objet d'accords mutuel, ne rentrèrent pas dans le domaine de compétence du VICH. Par contre, les sujets relatifs aux produits biologiques furent considérés comme appropriés et tombant dans le champ du VICH.

Le document de discussion préparé par la COMISA⁵ pour le Comité de direction fut fondamental pour la sélection de sujets prioritaires à être considérés par le VICH. Ce rapport :

3 FEDESA: Fédération européenne de la santé animale. En 2002, la FEDESA est devenue l'IFAH, International Federation for Animal Health.

4 JEFCA : Comité d'expert commun à la FAO et à l'OMS sur les additifs alimentaires.

5 COMISA : Confédération mondiale de l'industrie de la santé animale.

- Évalue parmi les lignes directrices de l'ICH celles qui pourront être adaptées au programme VICH ;
- Définit en détail les domaines qui ne sont pas harmonisés entre les États-Unis, le Japon et l'Union Européenne et fournit une série de « concept papers » sur des sujets clés ; et
- Propose des suggestions préliminaires concernant les sujets prioritaires.

Une fois tout ce travail de fond achevé, le Comité directeur du VICH tint sa première réunion en avril 1996, au terme de laquelle la composition des membres et les procédures de travail furent entérinées et le programme de travail établi.

d) Les objectifs du VICH

Les objectifs du VICH suivent la même direction que ceux de l'ICH.

- Établir et mettre en œuvre dans le cadre du VICH pour les régions concernées des obligations réglementaires harmonisées concernant les produits pharmaceutiques vétérinaires afin d'arriver à un haut degré de qualité, d'innocuité et d'efficacité grâce aux normes et de minimiser l'utilisation des tests animaux et le coût du développement du produit ;
- Fournir une base pour une plus large harmonisation internationale des obligations concernant l'enregistrement ;
- Contrôler et maintenir l'existence des lignes directrices du VICH, tout en assurant une attention particulière au programme de travail de la Conférence internationale sur l'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des produits pharmaceutiques à usage humain (ICH). Si nécessaire les mettre à jour.
- Assurer un processus efficace pour maintenir et contrôler une interprétation cohérente des obligations concernant les données demandées qui font suite à la mise en œuvre des lignes directrices du VICH.
- Fournir un guide technique permettant de répondre aux problèmes globaux majeurs et émergents et aux sciences qui ont un impact sur les obligations réglementaires au sein des régions concernées par le VICH et cela au moyen d'un dialogue constructif entre les autorités réglementaires et l'industrie.

e) Les progrès réalisés en vue d'atteindre les objectifs fixés par la VICH

- Pour les produits immunologiques vétérinaires, il y a un programme d'harmonisation en cours dans un grand nombre de domaines incluant les études pour l'innocuité chez les espèces cibles, la réversion vers la virulence et les tests concernant la présence de *Mycoplasma*. Jusqu'à présent seul un nombre relativement faible de lignes directrices du VICH a été élaboré pour les produits biologiques vétérinaires, ce qui met en lumière la difficulté des trois régions à trouver un accord sur les produits biologiques vétérinaires.
- Les deux seules lignes directrices du VICH adoptées pour les produits biologiques vétérinaires concernent les tests de formol résiduel, adoptée en mai 2003 et les tests d'humidité résiduelle, adopté également en mai 2003.

Suite à une profonde réflexion tenue par toutes les parties concernées par le VICH sous les auspices de l'OIE, la seconde phase du VICH pour la période 2006–2010 a été publiquement lancée durant une conférence publique « VICH3 » qui eut lieu à Washington en mai 2005.

Plus d'information sont disponibles à l'adresse Internet suivante : <http://vich.eudra.org>.

CONCLUSION

À l'heure actuelle, il existe une volonté évidente d'atteindre une meilleure harmonisation internationale des obligations réglementaires pour les produits biologiques vétérinaires (14). Des progrès ont déjà été effectués par le biais des organisations internationales pour permettre une compétition équitable de la commercialisation des produits biologiques vétérinaires. Bien que les efforts menés par les organisations internationales n'aient pas abouti à un niveau d'harmonisation suffisant pour faciliter les échanges internationaux, ils ont permis de conduire les travaux préparatoires pour des efforts actuels. Les autorités nationales reconnaissent les avantages de l'harmonisation et sont maintenant engagées pour travailler vers cet objectif.

Les efforts des organisations internationales ont rendu possible les objectifs d'harmonisation et ont abouti à une organisation et une méthode pour progresser vers ce but. Le succès dans cette démarche dépendra de la volonté

des autorités nationales participantes de travailler ensemble et d'accepter des compromis qui seront nécessaires pour résoudre les difficultés scientifiques et les problèmes réglementaires.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANON (1960). The Pharmaceutical Affairs Law. Japan Law No. 145 in 1960, as amended on 26 June 1996. Pharmaceutical Affairs Law, Enforcement Ordinance and Enforcement Regulations, Yakugyo Jiho, Japan, 2–91 (in Japanese and English).
2. ANON (2002). The Minimum Requirements for Biological Products for Animal Use. Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries Notice No. 1567 in 2002, as amended ON 3 May 1993. Japan Association of Veterinary Biologics, Tokyo, Japan, 1–680 (in Japanese).
3. ANON (2002). The Assay Standard for Biological Products for Animal Use. Ministry of agriculture, Forestry and Fisheries Notice No. 1568 in 2002, as amended at 25 September 1997. Japan Association of Veterinary Biologics, Tokyo, Japan, 1–507 (in Japanese).
4. ARTIGES A. (1997). The role of the pharmacopoeias. *In: Veterinary Vaccinology*, Pastoret P.P., Blancou J., Vannier P. & Verschueren C., eds. Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands, 674–679.
5. BRUNKO P. (1997). Procedures and technical requirements in the European Union. *In: Veterinary Vaccinology*, Pastoret P.P., Blancou J., Vannier P. & Verschueren C., eds. Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands, 705–717.
6. CODE OF FEDERAL REGULATIONS (2006). Animals and Animal Products, Title 9, Parts 1–199. The Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration. US Government Printing Office, Washington DC, USA.
7. EUROPEAN UNION (1999). The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Eudralex, Vols 4–9. Office Publications of the European Communities, Luxembourg.
8. JOINT FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)/WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) EXPERT COMMITTEE ON BRUCELLOSIS (1986). Sixth Report. WHO Technical Report Series No. 740, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 132 pp.
9. MAKIE H. (1998). The activities of veterinary vaccine control laboratories. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **17**, 578–584.
10. MESLIN F.-X., KAPLAN M.M. & KOPROWSKI H. (1996). Laboratory Techniques in Rabies. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 476 pp.
11. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (2004). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), Fifth Edition. Office International des Epizooties, Paris, France.
12. PASTORET P.P. & FALIZE F. (1998). Licensing procedures for immunological veterinary medicinal products in the European Union. *Adv. Vet. Med.*, **41**, 595–607.
13. TRUSZCZYNSKI M. & BLANCOU J (1992). The role of the Office International des Epizooties in the standardisation of biologicals. *In: Symposium on the First Steps Towards an International Harmonization of Veterinary Biologicals and Free Circulation of Vaccines within the EEC*, Ploufragan, 1992. *Dev. Biol. Stand.*, **79**, 95–98.
14. VANNIER P., TRUSZCZYNSKI M. & ESPESETH D. (1997). Implementing International harmonisation. *In: Veterinary Vaccinology*, Pastoret P.P., Blancou J., Vannier P. & Verschueren C., eds. Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands, 712–717.
15. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDISATION (1992). Forty-second Report. WHO Technical Report Series No. 822, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 84 pp.
16. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) EXPERT COMMITTEE ON RABIES (1992). Eighth Report. WHO Technical Report Series No. 824, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 75 pp.

*
* *

PARTIE 2

MALADIES DE LA LISTE DE L'OIE ET AUTRES MALADIES IMPORTANTES POUR LE COMMERCE INTERNATIONAL

SECTION 2.1.

MULTI-ESPÈCES

CHAPITRE 2.1.1.

FIÈVRE CHARBONNEUSE

RÉSUMÉ

Définition de la maladie : la fièvre charbonneuse (FCh) est, avant tout, une maladie des herbivores, mais tous les mammifères, y compris l'homme, et quelques espèces aviaires, peuvent aussi être frappés. La mortalité peut être très élevée, surtout chez les herbivores. *Bacillus anthracis*, bacille sporulé, Gram positif, en forme de bâtonnet, en est l'agent causal. La maladie reconnaît une distribution mondiale et constitue une zoonose.

Description de la maladie : des exotoxines sont à l'origine de la maladie. Des formes suraiguës, aiguës, subaiguës et, plus rarement chroniques, sont décrites. Les signes cliniques ante mortem peuvent passer inaperçus dans les formes suraiguës et aiguës de la maladie. L'évolution subaiguë peut être accompagnée d'une atteinte de l'état général : fièvre de développement progressif, inappétence, faiblesse, prostration puis mort. Les formes aiguë, subaiguë et chronique peuvent se traduire par des tuméfactions localisées, de la fièvre et, dans la forme chronique, l'hypertrophie des nœuds lymphatiques peut n'être que le seul symptôme.

Identification de l'agent pathogène : *Bacillus anthracis* est facilement isolé, en nombre relativement important, du sang ou des tissus d'un animal récemment mort de FCh, et la morphologie des colonies de *Bacillus anthracis* est caractéristique, après une nuit d'incubation sur gélose au sang. Elles sont relativement larges, de 0,3 à 0,5 cm de diamètre. Elles sont blanc-grisâtre à grises, non hémolytiques, d'aspect rugueux en « verre pilé », de consistance pâteuse et collante. Les cellules végétatives de *B. anthracis* sont volumineuses, mesurant 3 à 5 µm de longueur et environ 1 µm de large. Des spores centrales, ovoïdes, ne déformant pas le bacille, apparaissent en fin de phase exponentielle de croissance. Les cellules retiennent fortement le Gram et forment souvent de longues chaînes *in vitro*, alors que des paires ou de courtes chaînes sont vues *in vivo*. La mise en évidence de bacilles encapsulés, habituellement en grand nombre, sur un frottis sanguin coloré au bleu de méthylène polychrome (coloration de M'Fadyean) suffit à faire un diagnostic rapide.

Épreuves sérologiques : la mise en évidence des anticorps sériques chez l'animal infectée, est rarement utilisée à des fins diagnostiques et demeure un outil de recherche. La méthode de choix est la méthode immuno-enzymatique (ELISA).

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : Le vaccin anti-charbonneux destiné au bétail, le plus largement utilisé, mis au point par Max Sterne en 1937, est une suspension de *B. anthracis* vivant, acapsulogène, sporulée. En Russie et dans certains pays de l'Est européen, le même type de vaccin est utilisé (souche 55). Le vaccin de Pasteur n'est plus utilisé en Italie. Une nouvelle souche, Carbosap, a été développée ; elle conserve les plasmides et demeure de virulence très faible. Une liste de producteurs est donnée dans le rapport technique anthrax de l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

A. INTRODUCTION

La fièvre charbonneuse est une maladie bactérienne, affectant avant tout les herbivores, mais aussi transmissible à l'homme. L'agent pathogène est *Bacillus anthracis*, un bacille en forme de bâtonnet, Gram positif, sporulé. La fièvre charbonneuse est connue sous diverses dénominations à travers le monde : anthrax, maladie des trieurs de laine, maladie des chiffonniers, charbon malin et pustule maligne.

Les animaux contractent la maladie en ingérant des spores et peut être aussi en étant piqués par des mouches ayant pris auparavant un repas sanguin sur un animal ou sur une carcasse infectés. Les animaux infectés sont en général retrouvés morts car la mort peut survenir en 24 h. Un examen post-mortem soigneux des animaux morts depuis peu permet d'observer un certain nombre de lésions, mais aucune d'entre elles n'est constante ou pathognomonique. Pour prévenir la contamination de l'environnement, il est recommandé de ne pas effectuer d'autopsie sur les cadavres de cas suspects ou confirmés. Les lésions les plus fréquentes sont celles d'une septicémie généralisée souvent accompagnée d'une hypertrophie de la rate qui présente une consistance de « confiture de mûre » et un sang qui coagule mal. Les hémorragies par le nez, la bouche, la vulve et/ou l'anus au moment de la mort ne sont pas des signes fréquents.

L'agent pathogène, *Bacillus anthracis*, est un bacille en forme de bâtonnet, Gram positif ; il est le seul agent pathogène strict dans le genre *Bacillus*. La plupart des autres espèces de *Bacillus* sont des saprophytes communs et ubiquistes de l'environnement, bien que certains, notamment *B. cereus*, *B. licheniformis* et *B. subtilis* soient occasionnellement rencontrés dans des intoxications alimentaires chez l'homme ou d'autres manifestations cliniques, à la fois chez l'homme et l'animal.

Dans plus de 95 % des cas chez l'homme, la fièvre charbonneuse apparaît sous une forme cutanée qui est la conséquence de la manipulation de cuirs et peaux ou de viandes et d'os provenant de carcasses infectées. *Bacillus anthracis* n'est pas invasif et une lésion préalable est nécessaire pour qu'une personne s'infecte. Pour se protéger les vétérinaires et les autres personnes en contact avec des animaux doivent porter des gants et des habits de protection quand ils manipulent des carcasses suspectes, et ne doivent jamais se frotter le visage ou les yeux. La forme gastro-intestinale de la fièvre charbonneuse peut survenir lors de la consommation de viandes provenant d'animaux infectés.

Le risque d'inhalation de doses infectieuses de spores devient significatif lors d'activités comprenant le traitement de produits d'origine animale dans la fabrication de produits dérivés (charbon industriel). Il s'agit du traitement des peaux, de la laine, de la fabrication des tapis, du travail des os, et autres transformations où la possibilité de formation d'aérosols riches en spores accroît le risque d'exposition à des doses infectieuses.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

La mise en évidence de *B. anthracis* encapsulés sur des frottis de sang ou de tissus provenant de cadavres frais ainsi que la culture de la bactérie sur gélose au sang sont relativement faciles et à la portée de la plupart des laboratoires de bactériologie. La difficulté peut se présenter lors de cas chez le porc et les carnivores, où la bactériémie terminale est souvent peu marquée, ainsi que chez les sujets ayant reçu des antibiotiques avant la mort.

L'isolement de *B. anthracis* à partir d'un cadavre putréfié, de prélèvements traités (poudre d'os, peau), ou d'échantillons de l'environnement (sol contaminé) est, aussi, souvent difficile et réclame des procédures exigeantes et laborieuses.

a) Culture et identification de *Bacillus anthracis*

i) Prélèvement frais

Bacillus anthracis se multiplie sur la plupart des géloses nutritives, bien que la gélose avec 5-7 % de sang de cheval ou de sang de mouton soient les milieux de choix. Le sang est le premier prélèvement à examiner. Du sang ou autre liquide organique, ou bien un prélèvement issu d'une incision d'un tissu ou d'un organe, est étalé à la surface d'une gélose au sang. Après une incubation d'une nuit à 37 °C, les colonies de *B. anthracis* apparaissent de couleur blanc-gris à gris, de 0,3-0,5 mm de diamètre, non hémolytiques, de surface humide rugueuse (aspect de verre pilé) et très collantes lorsqu'on les touche avec une anse de platine. Des prolongements et excroissances de culture rampant en retour vers la colonie parentale, tous dans le même sens, sont parfois constatés. Cette caractéristique a été décrite comme un aspect en « tête de méduse ». La confirmation de *B. anthracis* peut être obtenue par la mise en évidence sur gélose au sang, de bâtonnets Gram positif, capsulés et formant une spore. L'absence de mobilité peut être recherchée en test complémentaire.

La sensibilité de *B. anthracis* au bactériophage gamma fut décrite par Brown & Cherry en 1955 (3). Le phage peut être obtenu auprès de divers laboratoires centraux vétérinaires et autres laboratoires de référence de la FCh. La méthode consiste simplement, à étaler sous la forme d'une bande, à la surface d'une gélose au sang ou sur une portion de la plaque (plusieurs tests peuvent être réalisés sur la même plaque), le germe suspect, et, à déposer une goutte de 10-15 µl de la suspension de phage d'un côté de la bande ainsi qu'un disque de 10 unités de pénicilline sur l'autre extrémité. Laisser la goutte de phage pénétrer la gélose et incuber la plaque à 37 °C. Une culture de contrôle doit être incluse ; le vaccin Sterne peut être utilisé dans ce but. Si la culture correspond à *B. anthracis* la zone située sous le phage sera sans croissance bactérienne en rapport avec la lyse, et une zone d'inhibition entourera le disque de pénicilline après une nuit d'incubation (*à noter : des souches de B. anthracis résistant au phage sont très occasionnellement isolées ; de la même façon, la littérature scientifique rapporte que des souches pénicillino-résistantes ont été observées*).

ii) Mise en évidence de la capsule

Des bactéries *Bacillus anthracis* virulentes encapsulées sont présentes dans les tissus, le sang et autres fluides organiques d'animaux venant de succomber à la FCh. Elles doivent être recherchées sur des frottis de ces prélèvements qui ont été séchés, fixés et colorés au bleu de méthylène polychrome (réaction de M'Fadyean). La capsule apparaît en rose, tandis que les bacilles se colorent en bleu foncé. Ces derniers sont disposés en paires ou en courtes chaînettes et présentent des extrémités à bout carré (les chaînettes sont souvent comparables à une série de wagons de chemin de fer et leur image est qualifiée d'apparence en « box-car »). Les colorations de Gram et de Giemsa ne révèlent pas la capsule. La capsule est absente des cultures aérobies de *B. anthracis* sur gélose nutritive ou sur bouillon, mais elle peut être vue lorsque la bactérie virulente est placée pendant quelques heures dans quelques millilitres de sang (le sang défibriné de cheval ou de mouton donne les meilleurs résultats). Une autre solution permettant l'expression de la capsule consiste à cultiver *B. anthracis* sur une gélose nutritive additionnée de 0,7 % de bicarbonate de sodium et incubée en présence de CO₂ (20 % est optimale mais un bocal muni d'une bougie peut suffire). La gélose nutritive est préparée en dissolvant suffisamment de poudre base pour obtenir 100 ml de gélose, dans 90 ml d'eau. La préparation est autoclavée puis refroidie à 50 °C au bain-marie ; 10 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 7 % stérilisée par filtration (filtre de 0,22-0,45 µm) sont ajoutés et mélangés. Le mélange est alors réparti en boîtes de Petri. Les *B. anthracis* encapsulés formeront des colonies mucoïdes et la capsule pourra être visualisée sur de fins frottis ou décalques réalisés sur des lames pour microscope, fixés et colorés au bleu de méthylène polychrome comme précédemment.

iii) Autres prélèvements

L'identification de *B. anthracis* à partir de prélèvements anciens ou décomposés, issus de produits d'origine animale traités ou de l'environnement y compris le sol, est possible, mais ces prélèvements renferment le plus souvent des contaminants saprophytes qui envahissent les cultures et masquent *B. anthracis* sur les géloses ordinaires. Les modalités suivantes sont proposées :

- a) Le prélèvement est mélangé à 2 volumes d'eau distillée ou dé-ionisée puis placé au bain-marie à 62,5 ± 0,5 °C pendant 30 à 60 min.
- b) Des dilutions de raison 10 (10⁻² ou 10⁻³) sont alors préparées. 10 à 100 µl de chaque dilution sont étalés sur des géloses au sang et de manière optionnelle 250 à 300 µl sur des géloses PLET (polymyxine, lysozyme, EDTA [éthylène diamine acide tétra-acétique] et acétate de thallium) (7,11). L'ensemble des boîtes est incubé à 37 °C.
- c) Les boîtes de géloses au sang sont examinées pour rechercher les colonies typiques déjà décrites, après une nuit d'incubation ; les géloses PLET, après 40 à 48 h. La confirmation de l'identité des colonies suspectes est réalisée comme décrit ci-dessus.

Le milieu PLET (7, 11) est élaboré à partir de la gélose base infusion de cœur (DIFCO) préparée selon les instructions du fabricant, à laquelle on ajoute 0,25 à 0,3 g/litre d'EDTA et 0,04 g/litre d'acétate de thallium (*à noter que l'acétate de thallium est toxique et doit être manipulé avec précaution*). Le mélange est autoclavé puis uniformément refroidi à 50 °C avant l'addition de polymyxine à raison de 30 000 unités/litre et du lysozyme à raison de 300 000 unités/litre. Après parfait mélange, la gélose est répartie en boîte de Petri.

Des procédures de mise en évidence directe par une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) de *B. anthracis* dans le sol et autres supports du milieu ambiant ont été publiées. Mais aucune n'est appliquée en routine à l'heure actuelle.

Le recours à l'inoculation de l'animal ne peut être envisagé pour révéler *B. anthracis* que si les autres méthodes ont échoué. Par exemple lorsqu'il apparaît que les prélèvements proviennent d'animaux ayant reçu des antibiotiques avant la mort ou lorsque les échantillons du milieu renferment des substances sporostatiques. En raison du souci légitime d'écarter le recours à l'animal en recherche biologique, cette solution ne doit être retenue que si elle est justifiée. Les souris adultes ou les cobayes sont les animaux de

choix. Si les prélèvements concernent le sol, les animaux doivent être traités la veille avec des antisérums du tétanos et des gangrènes gazeuses. Les prélèvements sont préparés comme pour la mise en culture (voir Section B.1.a. ci-dessus), le choc thermique à 62,5 °C pendant 15 min inclus. L'injection consiste chez la souris en une injection de 0,05 à 0,1 ml en sous-cutanée et chez le cobaye, l'injection peut aller jusqu'à 0,4 ml (0,2 ml dans chaque cuisse) et est réalisé par voie intra-musculaire. La présence de *B. anthracis* entraîne la mort en 48 à 72 h et le germe peut être isolé du sang comme décrit ci-dessus.

b) Mise en évidence immunologique et diagnostic

On doit garder présent à l'esprit que *B. anthracis* est antigéniquement très proche de *B. cereus*, qui est un composant presque ubiquitaire de la microflore de l'environnement. Les seuls antigènes spécifiques qui permettent de le différencier par l'approche immunologique, sont les antigènes des toxines charbonneuses produites durant la phase de croissance exponentielle, et de la capsule de *B. anthracis*. Cet état de fait gêne considérablement le recours aux méthodes immunologiques en diagnostic de routine.

i) La réaction d'Ascoli

En 1911, Ascoli (1) publia une technique de mise en évidence d'un antigène charbonneux thermostable dans les tissus animaux traités pour obtenir des produits dérivés. Celle-ci utilise un antisérum précipitant préparé sur lapin. Cette réaction manque de spécificité car les antigènes thermostables de *B. anthracis* se retrouvent chez d'autre *Bacillus spp.* et suppose que seul *B. anthracis* ait proliféré dans les tissus de l'animal et qu'il y ait eu suffisamment d'antigène déposé pour donner une réaction positive. A l'heure actuelle, la méthode semble n'être plus utilisée qu'en Europe de l'Est.

Pour effectuer la réaction d'Ascoli, mettre environ 2 g d'échantillon dans 5 ml de sérum physiologique contenant une concentration finale de 1/100 d'acide acétique et faire bouillir l'ensemble pendant 5 min. Refroidir la solution et la passer à travers un papier filtre. Quelques gouttes d'antisérum préparé chez le lapin (voir préparation ci-dessous) sont introduites au fond d'un petit tube. Le filtrat précédent est déposé délicatement à la surface de l'antisérum. Une réaction positive se traduit par la formation, à l'interface, d'un anneau de précipitation visible en moins de 15 min. Des témoins d'échantillons positif et négatif sont à inclure.

L'antisérum est préparé chez le lapin par injection sous-cutanée du vaccin Sterne au jour J 1 et J 14. A J 28 et J 35, les lapins reçoivent 0,5 ml d'un mélange de plusieurs souches virulentes de *B. anthracis* ne dépassant pas 10^5 unités formant colonies (UFC) suspendues en sérum physiologique. Autre possibilité : les bactéries virulentes peuvent être inactivées par suspension prolongée dans du sérum physiologique formolé à 0,2 %, mais la masse antigénique doit dépasser 10^8 - 10^9 UFC/ml. L'inactivation de *B. anthracis* dans la suspension doit être vérifiée avant l'injection au lapin, par mise en culture de 0,1 ml dans 100 ml de bouillon nutritif contenant 0,1 % d'histidine et, après incubation à 37 °C pendant 7 jours, par sub-culture sur gélose nutritive ou au sang. Le protocole d'injection de la suspension formolisée après la vaccination initiale à J 1 et J 14, consiste en des doses croissantes de 0,1, 0,5, 1, et 2 ml, administrées par voie intra-veineuse à intervalle de 4 à 5 jours. Dans les deux cas, une prise de sang réalisée 10 jours après la dernière injection doit permettre de déterminer si de nouvelles injections de 2 ml sont nécessaires pour accroître le titre en précipitine.

ii) Immunofluorescence

Bien que l'immunofluorescence ait été utilisée avec succès dans le cadre de recherche sur la capsule (4), elle n'est pas entrée dans le diagnostic de routine.

c) Confirmation de la virulence par la réaction d'amplification en chaîne par polymérase

Une confirmation sans appel de la virulence peut être obtenue grâce à une PCR. Les instructions suivantes sont empruntées à la réf. 11. L'extrait d'ADN pour la PCR, peut être préparé à partir d'une colonie fraîche obtenue sur gélose nutritive, en mettant en suspension dans 25 µl d'eau stérile dé-ionisée (ou distillée), une anse de culture, puis en chauffant celle-ci à 95 °C pendant 20 min. Après refroidissement autour de 4 °C et une brève centrifugation, le surnageant est prêt pour la PCR.

Les amorces convenables (2, 5) permettant de confirmer la présence des plasmides pX01 et pX02, sont données dans le tableau suivant.

Cible	amorce ID	Séquence 5'–3'	taille	Concentration
Antigène protecteur (PA, <i>Protective Antigen</i>)	PA 5 3048–3029	TCC-TAA-CAC-TAA-CGA-AGT-CG	596 bp	1 mM
	PA 8 2452–2471	GAG-GTA-GAA-GGA-TAT-ACG-GT		
Capsule	1234 1411–1430	CTG-AGC-CAT-TAA-TCG-ATA-TG	846 bp	0,2 mM
	1301 2257–2238	TCC-CAC-TTA-CGT-AAT-CTG-AG		

La PCR peut être conduite dans des volumes de 50 µl en utilisant les amorces précédentes et respectivement 200 µM de dATP, de dCTP, de dTTP et dGTP, 1,5 mM de MgCl₂ et 2,5 unités d'ADN polymérase ampli Taq,™¹, le tout en tampon NH₄, suivi de l'addition de 5 µl de l'extrait d'ADN. Un gel à 2 % d'agarose peut être efficacement utilisé avec ces petits fragments.

Autre possibilité, des perles « Ready-To-Go™ » sont commercialisées par Pharmacia Biotech². Elles sont chargées en réactifs (à l'exception de l'amorce et de l'acide nucléique), prêtes à l'emploi (réaction sous un volume de 25 µl), déshydratées et stable à température ambiante. L'extrait d'ADN peut être ajouté sous un volume de 2,5 µl.

Le cycle PCR suivant peut être adopté : 1 × 95 °C pendant 5 min ; 30 × 95 °C pendant 30 s suivis de 55 °C pendant 30 s, puis 72 °C pendant 30 s ; 1 × 72 °C pendant 5 min ; et enfin refroidir à 4 °C.

Il est à noter que, en usage depuis quelques années dans les laboratoire de référence de la FCh, les amorces données dans le tableau ci-dessus ont été satisfaisantes pour confirmer la présence ou l'absence de pXO1 et/ou pXO2 dans les cultures pures d'isolats obtenus de prélèvements d'animaux (y compris d'homme) ou d'échantillons du milieu ambiant. Elles sont inopérantes, néanmoins, pour détecter directement *B. anthracis* dans de tels prélèvements. Un choix d'autres possibilités peut être fait dans les références 6 et 9. Dans le cas exceptionnel où un isolat serait dénué à la fois de pXO1 et pXO2, un marqueur chromosomique peut être aussi utilisé ; les amorces correspondantes sont aussi décrites dans les références 6 et 9.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Le vaccin le plus largement utilisé pour prévenir la FCh chez l'animal fut développé par Sterne en 1937 (10). Il est issu d'un variant R d'une souche virulente de *B. anthracis* obtenu sur gélose-sérum en atmosphère élevée en CO₂. Ce variant, dénommé 34F2, était incapable de synthétiser une capsule et fut reconnu, plus tard, dépourvu du plasmide pXO2 codant pour la capsule. Il représente la souche la plus largement utilisée dans le monde pour la production de vaccin anti-charbonneux. En Europe Centrale et de l'Est, un dérivé pXO2 équivalent, la souche 55, est le principe actif du vaccin destiné au bétail. Une liste des fabricants de vaccins anti-charbonneux à usage vétérinaire est donnée dans l'appendice V de la référence 11.

Les informations suivantes sur la fabrication du vaccin anti-charbonneux destiné à l'animal sont issues des références 8 et 12. Les procédures générales sont données ; les autorités nationales en charge de la réglementation doivent être consultées sur les particularités locales en relation avec les procédures de préparation normalisées.

1. Gestion des semences bactériennes

a) Caractéristiques de la semence bactérienne

La production du vaccin anti-charbonneux fait appel au système lot-semence. Un lot de semence est une quantité donnée de spores, de composition uniforme, préparée en une seule fois et conservée pour la préparation du vaccin. Chaque lot de semence est issu d'un maximum de 3 passages de la culture

1 Ce produit est disponible auprès de Applied Biosystems :
(<https://products.applied-biosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601622>)
2 Uppsala, Suède, produit numéro 27-9555-01

parentale et doit produire un vaccin efficace et inoffensif chez l'animal. Il est recommandé de préparer une grande quantité de lot-semence à partir de la souche parentale et de la conserver à l'état lyophilisé en vue des futures productions de lots de vaccin. La culture parentale peut être achetée³. Le lot-semence est acceptable pour la fabrication de vaccin si le vaccin préparé à partir de ce lot semence ou si une suspension récoltée d'une culture du lot-semence, répond aux exigences du produit fini, à savoir l'absence de contaminants bactériens, l'innocuité et l'efficacité (immunogénicité).

b) Préparation du lot de semence primaire

Les lots-semence sont cultivés sur milieux solides dont la composition induit la sporulation de la bactérie (voir Section C1.2. ci-dessous). La formule de milieu solide donnée dans la référence 8 est la suivante : 50 g de digestion tryptique de caséine ; 10 g d'extrait de levure ; 0,1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 5,0 g de K_2HPO_4 ; 1,0 g de KH_2PO_4 ; 22 g de gélose ; 1 000 ml d'eau dé-ionisée ou distillée. Les ingrédients sont dissous à chaud dans l'eau ; la solution est ajustée à pH 7,4, répartie en flacons de Roux (120 ml par flacon) ou autres récipients adaptés, stérilisée à l'autoclave et refroidie en position horizontale. Après solidification de la gélose, l'excès de liquide est enlevé stérilement et les flacons sont laissés à l'étuve (37 °C) pendant au moins 2 jours pour séchage et contrôle de la stérilité.

Des volumes de 2 ml de semence vaccinale provenant d'un laboratoire de référence sont étalés à la surface de la gélose contenue dans les flacons de Roux et incubés à 37 °C jusqu'à ce que 80 % de sporulation soit constaté par examen microscopique d'un prélèvement stérile réalisé à l'anse de platine (au moins 72 h). La culture est récoltée à l'aide de 10 ml par flacon d'eau dé-ionisée ou distillée et contrôlée pour sa pureté. Après lavage 3 fois en eau dé-ionisée ou distillée stérile, la suspension finale est additionnée d'un stabilisant stérile de lyophilisation puis répartie en flacons et lyophilisée.

c) Préparation et contrôle de la semence de travail

Réhydrater un flacon de stock de semence et ensemercer plusieurs géloses inclinées (environ 10 ml) de gélose sporulation (digestion de caséine). Incuber à 37 °C pendant 72 h et stocker au réfrigérateur. Contrôler la pureté par culture sur gélose nutritive et en bouillon nutritif (0,1 ml dans 100 ml de bouillon). Ce dernier sera passé sur gélose nutritive après une incubation de 7 jours à 37 °C et devra donner une culture pure de *B. anthracis*. Un prélèvement de la culture en bouillon permettra de vérifier l'absence de mobilité.

Les volumes de semence nécessaires à la production seront calculés sur la base du rendement en spores de chaque tube de gélose inclinée repris avec 10 ml d'eau dé-ionisée ou distillée et de son utilisation pour ensemercer 5 flacons de Roux.

d) Innocuité du lot de semence

Au moins 5×10^9 spores viables doivent être injectées par voie sous-cutanée à 3 moutons sains et non vaccinés, âgés de 1 à 2 ans. Ils doivent survivre après une période d'observation d'au moins 10 jours.

e) Immunogénicité du lot de semence

Au moins 10 cobayes en bonne santé, pesant entre 300 et 500 g, sont inoculés avec 5×10^6 spores viables et observés pendant 21 jours. Au moins 80 % des sujets doivent survivre. Les sujets immunisés, ainsi que 3 sujets contrôles non immunisés, sont éprouvés avec 10 doses létales médianes (LD_{50}) de la souche 17 JB de *B. anthracis*. Durant une période d'observation de 10 jours, aucun des cobayes immunisés ne doit succomber à l'épreuve alors que tous les témoins meurent de charbon. L'épreuve sera répétée si l'un des sujets immunisé meurt.

2. Méthode de fabrication

a) Préparation du concentré vaccinal

Des flacons de Roux contenant de la gélose digestion de caséine sont préparés comme pour la production de la semence primaire décrite à la Section C.1.b ci-dessus. Un flacon permet en moyenne de préparer 2 000 doses de vaccin. Chaque flacon est ensemercé avec 2 ml de suspension de la semence de travail, bouché au coton et incubé à 37 °C pendant plusieurs jours jusqu'à ce qu'une petite anse de platine de culture, prélevée sur des flacons choisis au hasard, révèle au moins 90 % d'organismes sporulés à l'examen microscopique en contraste de phase (spores en phase brillante) ou après coloration des spores. La culture de chaque flacon est alors récoltée avec 20 ml de sérum physiologique. La recherche de contaminants doit être effectuée par passage sur gélose nutritive et ensemençement de 100 ml de bouillon nutritif avec 0,1 ml

3 National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Royaume-Uni.

de la suspension, puis passage sur gélose nutritive après 7 jours à 37 °C, et vérification de l'absence de mobilité. Les récoltes acceptables (c'est à dire reconnues sans contaminants) sont alors mélangées.

b) Addition de glycérine

Du glycérol pur, neutre et stérile doit être ajouté à raison de 2 fois le volume du concentrat. De la saponine (0,1 % en concentration finale) peut aussi être ajoutée à ce stade si elle est prévue comme adjuvant. Mélanger intimement (le recours à des billes de verre stériles, peut être utile). Effectuer un test de pureté comme précédemment et laisser le mélange à température ambiante durant 3 semaines pour permettre la lyse des formes végétatives, puis déterminer le nombre de spores viables et stocker ensuite à l'état réfrigéré.

c) Détermination du titre et de la dilution à utiliser

Le nombre de spores viables du produit est alors calculé en étalant des dilutions de raison 10 sur de la gélose nutritive. La suspension est alors diluée pour obtenir, dans le produit fini, le nombre de spores viables désiré. Le liquide de dilution doit contenir les mêmes proportions de sérum physiologique, glycérol et (si elle est utilisée) saponine que dans le concentrat. Le vaccin doit contenir pas moins de 10 millions de spores viables par dose pour le bétail, le buffle et le cheval, et pas moins de 5 millions de spores par dose pour le mouton, la chèvre et le porc.

d) Innocuité

Le contrôle d'innocuité est effectué sur 2 moutons ou chèvres en bonne santé, en inoculant par voie sous-cutanée 2 fois la dose recommandée. Les animaux sont mis en observation pendant 10 jours. Le produit répond au test si aucune réaction générale n'apparaît et si pas plus d'un œdème transitoire n'est observé au point d'injection. Si le test est pratiqué sur le seul mouton, un œdème progressif indique que le vaccin n'est pas acceptable pour la chèvre.

e) Répartition du vaccin

La répartition du vaccin en récipients d'une ou plusieurs doses est réalisée selon les prescriptions du rapport technique No. 363 de l'OMS intitulé *General Requirements for Manufacturing Establishments and Control Laboratories* (Normes pour les produits biologiques No. 1), 1965, pp. 16-17. D'une façon générale, le produit fini est réparti de façon stérile dans un local différent de celui de la production, en évitant toutes possibilités de contamination ou altération. Le vaccin peut être lyophilisé après répartition dans des récipients appropriés au dosage. Les récipients sont scellés aussi tôt que possible avec un matériel qui n'altère pas le produit et qui demeure hermétique durant toute la durée de vie du vaccin.

3. Contrôle en cours de fabrication

Les contrôles de pureté reposent sur l'examen microscopique de frottis colorés réalisés à partir de cultures, et sur les tests de mobilité comme décrits dans la Section C.2.a.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Le vaccin est une suspension de spores vivantes de *B. anthracis* ; la norme de stérilité est sans objet, mais les lots doivent être contrôlés pour l'absence de contamination (voir Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »).

b) Efficacité

L'efficacité ou l'immunogénicité du lot en fin de production est évaluée de la façon suivante : au moins 10 cobayes en bonne santé pesant entre 300 et 500 g, reçoivent une dose de vaccin pour mouton. Les cobayes sont observés pendant 21 jours, et au moins 80 % des sujets doivent survivre durant la période d'observation. Les survivants immunisés et 3 cobayes témoins non vaccinés, sont alors éprouvés avec une dose appropriée de *B. anthracis* virulent. La dose recommandée est de 200 LD₅₀ de la souche Pasteur II (17JB), qui est disponible à la même source que la souche vaccinale Sterne 34F2. Si, dans les 10 jours après l'épreuve, tous les cobayes vaccinés survivent et les contrôles succombent, le lot est considéré satisfaisant. Si certains sujets vaccinés meurent durant la période d'observation suivant l'épreuve d'une cause autre que le charbon et si la mort n'est pas due au vaccin, l'épreuve doit être renouvelée.

c) Dose

La dose recommandée pour les bovins et les chevaux est un minimum de 1×10^7 spores viables ; pour les moutons, les chèvres et les porcs, de $1-5 \times 10^6$ spores viables. Le vaccin doit renfermer ces spores dans un volume approprié, c'est à dire 1×10^7 /ml.

d) Durée de l'immunité

La plupart des experts s'accordent sur une durée de bonne immunité pendant 1 an et un rappel annuel est conseillé. Les chevaux peuvent développer lentement l'immunité après une première vaccination ; quelques fabricants recommandent une vaccination initiale en 2 injections à 1 mois d'intervalle, suivie d'une seule injection en rappel annuel.

e) Stabilité

Dans la mesure où il n'existe pas de test acceptable pour évaluer la stabilité du vaccin anti-charbonneux, il est recommandé, pour chaque lot réparti, de déterminer le nombre de spores viables avant et après conservation à la température recommandée, pendant la période revendiquée. Il ne doit pas y avoir de diminution du nombre de spores viables.

f) Agents de conservation et stockage

Les spores de *B. anthracis* sont stables au sein du vaccin qu'il soit lyophilisé ou non ; aussi l'adjonction de conservateur n'est pas nécessaire. La conservation réfrigérée est recommandée (4 °C).

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Le vaccin est reconnu capable de provoquer la maladie chez certaines chèvres et lamas ; ceci peut être en rapport avec la présence de saponine utilisée comme adjuvant. Le vaccin n'est pas conseillé chez les femelles gestantes ni chez les animaux devant être abattus dans les 2 à 3 semaines après vaccination. Les législations locales peuvent spécifier d'autres délais dans certains pays ou régions, mais il n'existe aucune raison scientifique pour considérer que la viande provenant d'animaux en bonne santé dans les 2 semaines suivant la vaccination, ne puisse être manipulée et consommée par l'homme. L'administration simultanée d'antibiotique aux animaux vaccinés est contre-indiquée car les antibiotiques vont détruire le vaccin. Leur administration doit être différée pendant plusieurs jours précédents et suivants la vaccination. Les restes de vaccin, les flacons vides et le matériel utilisé pour la vaccination sont contaminés par des spores vivantes ; ils doivent ainsi être autoclavés, désinfectés ou incinérés. L'inoculation accidentelle à l'homme est traitée en extrayant autant qu'il est possible d'inoculum par compression du site et par lavage vigoureux de la blessure au savon et à l'eau. Une surveillance médicale est instituée si l'infection se développe.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Chaque lot de vaccin sera soumis à un test d'innocuité selon la Section C.2.d.

b) Activité

Chaque lot de vaccin sera soumis à un test d'activité selon la Section C.4.b.

6. Production du bactériophage « gamma » de diagnostic

Les phages spécifiques de la fièvre charbonneuse ont été isolés pour la première fois dans les années 1950, et le phage dénommé gamma a été signalé pour la première fois en 1955 ; il est rapidement devenu le phage de référence pour le diagnostic de la FCh. Le phage gamma appartient à la famille des phages de la FCh, tous étroitement apparentés (11). Parfois, des souches de *B. anthracis* phage-négatives ou des souches de *B. cereus* phage-positives peuvent être isolées. Même si le phage doit être utilisé en association avec d'autres tests pour la confirmation, il n'en est pas moins un outil utile et fiable.

Les suspensions de phage sont disponibles auprès des laboratoires vétérinaires centraux ou des laboratoires centraux de santé publique.

Les phages peuvent être multipliés et concentrés par le protocole suivant. Les phages sont conservés entre 2 et 4 °C mais pas congelés car ils sont rapidement inactivés.

Première étape

- i) Préparer une culture en nappe de la souche atténuée Sterne de *B. anthracis* sur des géloses au sang et incubé une nuit à 37 °C.
- ii) Inoculer environ 10 ml de bouillon nutritif avec les cultures récoltées des géloses et incubé à 37 °C pendant environ 4 h ou jusqu'à l'apparition d'un léger nuage ; réfrigérer.
- iii) Étaler 100 µl de la culture de l'étape ii) sur 3 géloses au sang pré-séchées et incubé à 37 °C pendant 30 à 60 min.
- iv) Sur la même gélose, étaler 100 µl de la suspension de phages à amplifier. Incuber à 37 °C pendant une nuit.
- v) Récolter la culture lysée par les phages dans 5 ml de bouillon nutritif puis effectuer un deuxième lavage avec 5 ml de bouillon. Incuber à 37 °C pendant une nuit.
- vi) Effectuer une filtration (filtre de 0,45 µm) et titrer en faisant tomber des gouttes de 20 µl de dilutions de 10 en 10 du filtrat (3 gouttes par dilution) sur des tapis de culture de *B. anthracis* préparée comme dans l'étape iii).

Deuxième étape

Il s'agit en gros du même protocole que celui de la première étape, mais en utilisant le filtrat obtenu au vi) pour récolter les phages à partir des géloses.

- vii) Préparer une culture en nappe de la souche Sterne comme au point iii). Incuber à 37 °C pendant 30 à 60 min.
- viii) Étaler 100 µl de la suspension de phages obtenue au point vi). Incuber à 37 °C pendant une nuit.
- ix) À 9 ml du filtrat du point vi), ajouter 1 ml de bouillon nutritif concentré 10 fois.
- x) Récolter les phages du point viii) avec 5 ml de la solution obtenue au point ix) puis réaliser un deuxième lavage avec 5 ml de la solution restante du point ix).
- xi) Ajouter 10 ml de bouillon nutritif (1×).
- xii) Incuber à 37 °C une nuit, filtrer et titrer.

Troisième étape

- xiii) Inoculer 100 ml de bouillon d'une infusion cœur-cerveau avec environ 2,5 ml de la culture du point ii). Incuber à 37 °C sur un agitateur rotatif jusqu'à apparition d'un trouble.
- xiv) Ajouter 20 ml du filtrat du point xii) et poursuivre l'incubation une nuit.
- xv) Le filtrat qui en résulte est vérifié pour la stérilité et titré par des dilutions de 10 en 10 sur des tapis de culture de la souche vaccinale comme dans le point vi) pour déterminer la concentration en phages. Le titre devrait être compris entre 10⁸ et 10⁹ unités formant plaque par ml.

7. Bleu de méthylène polychrome (colorant de M'Fadyean)

Le bleu de méthylène polychrome est préparé comme suit : 0,3 g de bleu de méthylène est dissout dans 30 ml d'éthanol à 95 % ; 100 ml d'hydroxyde de potassium (KOH) à 0,01 % sont mélangés à la solution de bleu de méthylène. Idéalement, la préparation doit être exposée à l'air et agitée périodiquement pendant au moins 1 an pour permettre son oxydation et sa maturation. L'addition de K₂CO₃ (à une concentration finale de 1 %) accélère la maturation du colorant, mais avant qu'il ne soit considéré comme fiable pour le diagnostic, sa qualité doit être éprouvée en parallèle avec un lot précédent reconnu fonctionnel sur une préparation convenable. Il est maintenant bien établi que les colorants qui donnent des résultats positifs avec des cultures de *B. anthracis* passées sur sang de cheval ne donnent pas de résultats positifs avec des prélèvements du terrain.

Lors de frottis pour coloration, seules de petites gouttes de sang ou de fluide tissulaire sont nécessaires. Un frottis mince et limité est préférable. Après fixation à l'éthanol et séchage, une petite goutte (environ 20 µl) de colorant est déposée sur le frottis et étalé avec une anse de platine. Après 1 min, le colorant est lavé avec de l'eau, la lame est époncée délicatement avec un papier buvard, séchée à l'air puis observée préalablement avec un objectif ×10 sous lequel les courtes chaînettes apparaissent comme de courts cheveux ; puis, ceux-ci sont observés avec l'objectif à immersion (×1 000) pour rechercher des capsules rosées entourant des bacilles colorés en bleu/noir. Pour éviter les contaminations de laboratoire, la lame et le papier buvard doivent être autoclavés ou plongés quelques heures dans une solution d'hypochlorite de sodium à 10 %.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ASCOLI A. (1911). Die Präzipitindiagnose bei Milzbrand. *Centralbl. Bakt. Parasit. Infectk.*, **58**, 63–70.
2. BEYER W., GLOCKNER P., OTTO J. & BOHM R. (1996). A nested PCR and DNA-amplification-fingerprinting method for detection and identification of *Bacillus anthracis* in soil samples from former tanneries. *Salisbury Med. Bull.*, No. 87, Special Suppl., 47–49.
3. BROWN E.R. & CHERRY W.B. (1955). Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. *J. Infect. Dis.*, **96**, 34–39.
4. EZZELL J.W. & ABSHIRE T.G. (1996). Encapsulation of *Bacillus anthracis* spores and spore identification. *Salisbury Med. Bull.*, No 87, Special Suppl., 42.
5. HUTSON R.A., DUGGLEBY C.J., LOWE J.R., MANCHEE R.J. & TURNBULL P.C.B. (1993). The development and assessment of DNA and oligonucleotide probes for the specific detection of *Bacillus anthracis*. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**, 463–472.
6. JACKSON P.J., HUGH-JONES M.E., ADAIR D.M., GREEN G., HILL K.K., KUSKE C.R., GRINBERG L.M., ABRAMOVA, F.A. & KEIM P. (1998). PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims: The presence of multiple *Bacillus anthracis* strains in different victims. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 1224–1229.
7. KNISELY R.F. (1966). Selective medium for *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*, **92**, 784–786.
8. MISRA R.P. (1991). Manual for the Production of Anthrax and Blackleg Vaccines. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) Animal Production and Health Paper 87, FAO, Rome, Italy.
9. RAMISSE V., PATRA G., GARRIGUE H., GUESDON J.L. & MOCK M. (1996). Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, **145**, 9–16.
10. STERNE M. (1937). The effect of different carbon dioxide concentrations on the growth of virulent anthrax strains. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.*, **9**, 49–67.
11. TURNBULL P.C.B., BOEHM R., COSIVI O., DOGANAY M., HUGH-JONES M.E., LALITHA M.K. & DE VOS V. (1998). Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals. WHO/EMC/ZDI/98.6. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
12. WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION (1967). Requirements for Anthrax Spore Vaccine (Live – for Veterinary Use) (Requirements for Biological Substances No. 13). World Health Organization (WHO) Technical Report Series No. 361. WHO, Geneva, Switzerland.

LECTURES SUPPLÉMENTAIRES

- A. LOGAN N.A. & TURNBULL P.C.B. (1998). *Bacillus* and recently derived genera. In: Manual of Clinical Microbiology, Seventh Edition, Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C. & Tenover R.H., eds. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 357–369.
- B. QUINN C.P. & TURNBULL P.C.B. (1998). Anthrax. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Vol. 3, Ninth Edition, Collier L., Balows A. & Sussman M., eds. Arnold, London, UK, 799–818.
- C. TURNBULL P.C.B., (ED.) (1996). Proceedings of the International Workshop on Anthrax. *Salisbury Med. Bull.*, Special Suppl. No. 87, 139 pages.
- D. TURNBULL P.C.B. (1998). Anthrax. In: Zoonoses. Biology, Clinical Practice, and Public Health Control. Palmer S.R., Soulsby E.J.L. & Simpson D.I.H., eds. Oxford University Press, Oxford, UK, 3–16.
- E. WHITFORD H.W. & HUGH-JONES M.E. (1994). Anthrax. In: Handbook Series in Zoonoses, Second Edition, Beran G.W., editor-in-chief. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 61–82.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence pour la fièvre charbonneuse (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

MALADIE D'AUIESZKY

RÉSUMÉ

La maladie d'Aujeszky ou pseudorage est due à un alphaherpèsvirus qui infecte le système nerveux central et d'autres organes, comme l'appareil respiratoire, de nombreux mammifères sauf l'homme et les grands singes. Elle atteint essentiellement le porc, son hôte naturel, qui demeure infecté de façon chronique après guérison clinique (à l'exception des porcelets de moins de 2 semaines qui meurent d'encéphalite). On peut lutter contre elle en bloquant les troupeaux infectés par la vaccination et/ou l'élimination des animaux infectés.

Un diagnostic de maladie d'Aujeszky peut être fait en mettant en évidence le virus (isolement du virus ou amplification en chaîne par polymérase [PCR]) ou, chez les suidés vivants, par une recherche d'anticorps.

Identification de l'agent pathogène : *l'isolement du virus de la maladie d'Aujeszky peut se faire en inoculant un broyat de tissu, par exemple de cerveau, d'amygdales ou d'écouvillonnage des cavités nasales ou de la gorge, à une culture de cellules sensibles comme la lignée cellulaire issue de rein de porc PK-15 ou SK6 ou à des cellules rénales mères ou secondaires. La spécificité de l'effet cytopathogène (ECP) est vérifiée par immunofluorescence, immunoperoxydase ou neutralisation par un sérum spécifique. L'ADN viral peut également être identifié par PCR, notamment par des techniques de PCR en temps réel.*

Épreuves sérologiques : *les anticorps de la maladie d'Aujeszky peuvent être révélés par séroneutralisation virale, agglutination au latex ou par réaction immuno-enzymatique (ELISA). Des coffrets ELISA sont disponibles dans le commerce dans de nombreux pays. Un sérum étalon international de l'OIE définit le seuil de détectabilité que les laboratoires doivent atteindre en routine pour le diagnostic sérologique de la maladie d'Aujeszky.*

Depuis 1990 environ, il est devenu possible de distinguer les anticorps résultant d'une infection naturelle de ceux induits par une vaccination avec des vaccins délévés.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *les vaccins, soit à virus atténué et délévé soit à virus inactivé, devraient prévenir ou pour le moins limiter l'excrétion virale chez le cochon infecté. À l'heure actuelle sont surtout produits des vaccins à virus vivants délévés naturellement ou expérimentalement d'une glycoprotéine (gG, gE ou gC).*

A. INTRODUCTION

La maladie d'Aujeszky ou pseudorage est due à un alphaherpèsvirus de la famille des *Herpesviridae*. Il atteint le système nerveux central et d'autres organes, comme l'appareil respiratoire, de nombreux mammifères sauf l'homme et les grands singes. Elle atteint essentiellement le porc, son hôte naturel, qui demeure infecté de façon chronique après guérison clinique (à l'exception des porcelets de moins de 2 semaines qui meurent d'encéphalite). On peut lutter contre elle en bloquant les troupeaux infectés par la vaccination et/ou par l'élimination des animaux infectés de manière latente.

L'isolement du virus de la maladie d'Aujeszky (VMA) est utilisé pour le diagnostic des formes cliniques de la maladie, mais d'autres techniques sont nécessaires pour le diagnostic des infections latentes. Cependant, à part les suidés, la plupart des espèces animales atteintes ne vivent pas suffisamment longtemps après l'infection pour produire une quantité décelable d'anticorps.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

a) Isolement du virus

Suite à l'apparition de signes cliniques (par exemple des encéphalites chez les herbivores et carnivores), le diagnostic de la maladie d'Aujeszky peut être confirmé par isolement du virus chez les porcs vivants, à partir d'écouvillonnages de la gorge, des cavités nasales ou des amygdales. Il peut l'être, *post mortem*, à partir surtout de l'encéphale, des amygdales, des poumons et de la rate. Chez les bovins, lorsque du prurit est constaté, un prélèvement de moelle épinière correspondant à la zone du prurit peut être utilisé. Chez les porcs infectés de façon latente, le ganglion trijumeau est celui qui donne les meilleurs résultats, mais l'isolement en culture à partir de ces animaux est difficile car les virus latents ne sont pas, en général, infectieux sauf en cas de réactivation.

Les prélèvements sont homogénéisés dans de l'eau physiologique ou du milieu de culture cellulaire contenant des antibiotiques et la suspension est clarifiée par centrifugation à 900 *g* pendant 10 min. Le liquide surnageant est utilisé pour l'inoculation de la culture cellulaire. De nombreuses cultures cellulaires (cellules mères ou lignées cellulaires) sont sensibles au virus de la MA, mais en général on utilise une lignée de cellules de rein de porc (PK-15). Le milieu de culture des cellules doit contenir des antibiotiques (comme 200 UI/ml de pénicilline ; 100 µg/ml de streptomycine ; 100 µg/ml de polymyxine et 3 µg/ml de fungizone).

Le virus de la MA produit un effet cytopathogène (ECP) qui apparaît généralement en 24 à 72 h, mais les cultures cellulaires doivent être incubées 5 à 6 jours. On voit apparaître des cellules réfringentes dans la couche cellulaire, puis le tapis cellulaire se décolle. Des syncytiums d'aspect et de taille variables se développent. En l'absence de tout ECP, il est recommandé de faire un passage aveugle. Une information complémentaire peut être obtenue en colorant à l'hématoxyline-éosine des lamelles supportant la culture cellulaire, en vue de mettre en évidence les inclusions acidophiles intranucléaires caractéristiques d'une infection par herpèsvirus, avec margination de la chromatine. Le virus peut également être identifié par immunofluorescence, immunoperoxydase ou neutralisation par un sérum spécifique.

L'isolement du virus de la MA permet de confirmer la suspicion, mais son échec ne permet pas de garantir l'absence d'infection.

b) Identification du virus par amplification en chaîne par polymérase

La technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) peut être utilisée pour révéler la présence du génome du virus dans des échantillons provenant d'organes ou de sécrétions. De nombreux laboratoires ont établi des protocoles efficaces mais, à l'heure actuelle, il n'existe pas au niveau international de protocole normalisé.

Cette technique est fondée sur l'amplification sélective d'une partie spécifique du génome en utilisant deux amorces situées à chaque extrémité de la séquence choisie. Dans un premier temps, l'ADN complet est isolé à l'aide de techniques classiques (à savoir la digestion par la protéinase K et l'extraction par le phénol-chloroforme) ou à l'aide de kit d'extraction de l'ADN disponibles dans le commerce. La séquence cible peut être amplifiée jusqu'à 10^6 fois à l'aide de cycles de dénaturation de l'ADN donnant des fragments d'ADN simple brin, d'hybridation des amorces et de synthèse des séquences complémentaires avec une ADN polymérase thermostable. Les amorces doivent être choisies de façon à amplifier une séquence conservée parmi les souches de virus de la MA, par exemple des fragments des gènes gB ou gD qui codent des glycoprotéines essentielles (10, 29).

Le produit amplifié peut être identifié par son poids moléculaire, déterminé par migration en gel d'agarose, et une confirmation peut être faite par la méthode d'hybridation Southern en utilisant une sonde complémentaire. Des techniques récentes utilisent une hybridation en milieu liquide avec des sondes marquées par enzymes ce qui donne une réaction colorée après incubation avec un substrat approprié. Des techniques plus récentes font appel à des sondes fluorescentes couplées à l'action d'une exonucléase et le suivi en temps réel de l'évolution du produit, ce qui permet en même temps l'amplification et la confirmation des fragments d'ADN, et augmente ainsi la rapidité et la spécificité de la PCR.

Dans tous les cas, le principal avantage de la PCR par rapport aux techniques classiques d'isolement du virus est la rapidité puisque, avec les équipements les plus modernes, le processus complet d'identification et de confirmation peut se faire en un jour. Cependant, en raison de la nature de l'épreuve, de nombreuses précautions doivent être prises pour éviter la contamination des échantillons avec de l'ADN étranger provenant de réactions antérieures ou d'une contamination de l'environnement du laboratoire (voir le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »).

Ceci peut limiter la valeur de l'épreuve dans de nombreux laboratoires sauf si des précautions sont prises pour prévenir la contamination par de l'ADN extérieur.

2. Épreuves sérologiques

Toute technique sérologique doit être suffisamment sensible pour donner une réponse positive avec le sérum étalon international de l'OIE. Ce sérum peut être obtenu auprès du Laboratoire de référence de l'OIE pour la maladie d'Aujeszky situé en France (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Pour les échanges internationaux, l'épreuve doit être suffisamment sensible pour fournir une réponse positive avec la dilution au demi du sérum étalon.

La neutralisation virale a été reconnue comme la méthode sérologique de référence (4, 28), mais pour le diagnostic et le dépistage, elle a été largement remplacée par la méthode ELISA qui permet une application sur une bien plus grande échelle (2, 12, 16, 18). Les épreuves peuvent être réalisées sur une grande variété de produits (sérum, sang total, lait) mais le sérum est préférable.

Une épreuve d'agglutination au latex a été mise au point et peut être utilisée pour le dépistage. Des kits de diagnostic sont disponibles dans le commerce.

a) Séroneutralisation (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

La neutralisation virale en culture cellulaire peut faire appel à différentes techniques qui diffèrent en fonction de la durée d'incubation du mélange virus/sérum (par exemple 1 h à 37 °C ou 24 h à 4 °C) et de la présence ou de l'absence de complément. La plupart des laboratoires utilisent une durée de 1 h à 37 °C, en l'absence de complément, car c'est facile et rapide. Cependant, la sensibilité peut être améliorée en augmentant la période d'incubation (24 h à 4 °C), ce qui permet la détection de niveaux d'anticorps 10 à 15 fois plus faibles que ceux révélés par la méthode de 1 h de contact. Pour les échanges internationaux, la méthode doit être suffisamment sensible pour détecter la dilution au demi du sérum étalon international de l'OIE.

La séroneutralisation virale ne permet pas de distinguer les anticorps d'origine vaccinale des anticorps d'origine infectieuse. Elle est l'une des deux épreuves répondant aux exigences du Chapitre du *Code sanitaire pour les animaux terrestres* de l'OIE quant il se réfère à « une épreuve de diagnostic pour le virus complet ».

Cellules : on utilise des cellules sensibles au virus de la MA; il peut s'agir de lignées cellulaires (par exemple, PK-15, SK6, MDBK) ou de cultures de cellules mères ou secondaires.

Milieu de culture cellulaire : le milieu dépend du type de cellules. Par exemple, le milieu pour les cellules PK-15 est le milieu minimum essentiel d'Eagle (MEM) avec 10 % de sérum de fœtus bovin et des antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine ou, à la place, 50 µg/ml de gentamicine).

Entretien des cellules : les cellules sont cultivées dans des récipients, de 7,5 cm² de surface, par exemple. Elles sont trypsées 1 ou 2 fois par semaine. Pour une trypsation hebdomadaire, les cellules sont cultivées dans 50 ml de milieu avec un taux de multiplication de cinq. Pour 2 trypsations par semaine, les cellules sont cultivées dans 30 ml de milieu, avec un taux de multiplication de 3.

Pour la trypsation, le milieu de culture est enlevé lorsque le tapis cellulaire est complet. Le tapis cellulaire est lavé avec environ 5 ml de mélange, dans un tampon isotonique, de trypsine/acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) (0,25 %) récemment décongelé. Le liquide de lavage est éliminé et la préparation est lavée de nouveau, avec seulement quelques groupes de trypsine. La boîte est placée dans une étuve à 37 °C pendant 5 à 10 min jusqu'à ce que les cellules se détachent. Quand le tapis est décollé et les cellules bien séparées, elles sont suspendues dans 90 ml de milieu de culture et cette suspension est distribuée dans 3 flacons de culture cellulaire de 75 cm² de surface.

Virus : une souche adéquate de virus de la MA, comme la souche Kojnok ou la souche NIA-3, est conservée à une température inférieure ou égale à -70 °C ou, sous forme lyophilisée, à 4 °C.

Préparation de la suspension de virus : le liquide de culture est enlevé d'un flacon de culture cellulaire contenant un tapis cellulaire complet. Environ 1 ml de la suspension virale de titre connu (environ 10⁷ DICT₅₀/ml [Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire]) est ajouté et le flacon est incubé à 37 °C pendant 1 h. Puis, 30 ml de milieu de culture sont ajoutés et le flacon est de nouveau incubé à 37 °C. Le flacon est examiné fréquemment jusqu'à ce qu'il y ait environ 75 % de destruction cellulaire (après environ 36 à 48 h). Il est alors congelé à une température inférieure ou égale à -20 °C pour faire éclater les cellules.

Le flacon est ensuite congelé et agité vigoureusement. Le milieu de culture est récolté et centrifugé à 1 500 *g* pendant 15 min. Le liquide surnageant est divisé en aliquots (d'environ 0,5 ml) distribués dans de petits tubes identifiés (la date et la référence du virus), conservés à une température inférieure ou égale à –70 °C jusqu'au moment de l'emploi.

Titration de la suspension virale : ce titrage est effectué selon la méthode de Reed et Muench ou celle de Kärber et le titre est exprimé par 50 µl et par ml.

La séroneutralisation virale nécessite l'emploi d'un sérum positif témoin de titre connu en anticorps neutralisant le virus de la MA (il doit être ajusté par rapport au sérum étalon international ou un sous-étalon préparé à partir de ce dernier) et d'un sérum négatif témoin (provenant d'un porc dépourvu d'anticorps de la MA, c'est-à-dire présent dans un effectif officiellement indemne de cette maladie). Les sérums à étudier doivent être de bonne qualité et séparés rapidement du caillot afin d'éviter toute toxicité.

On peut utiliser une technique qualitative ou quantitative de neutralisation virale, les deux étant décrites ci-dessous.

- **Technique qualitative**

- i) Le complément des sérums est inactivé par chauffage à 56 °C pendant 30 min.
- ii) Chaque sérum non dilué est placé dans 3 puits d'une microplaque pour culture cellulaire de 96 puits, à raison de 50 µl par puits.
- iii) 50 µl de suspension virale contenant 100 DICT₅₀ (ou 2×10^3 DICT₅₀/ml), obtenue en diluant la suspension virale de titre connu dans du milieu MEM, sont ajoutés dans chaque puits.
- iv) La microplaque est agitée et placée dans une étuve pendant 1 h à 37 °C (CO₂ optionnel).
- v) 150 µl de suspension cellulaire contenant environ 150 000 cellules/ml sont ajoutés à chaque puits.
- vi) La microplaque est couverte (pour une incubation en présence de CO₂) ou un film plastique est soigneusement appliqué sur les bords (pour une incubation en l'absence de CO₂). La microplaque est légèrement agitée pour obtenir une distribution des cellules sur le fond de chaque puits et elle est placée à l'étude à 37 °C (CO₂ optionnel).
- vii) *Témoins* : chaque lot de plaques doit comprendre les témoins suivants :

Témoin viral : il est destiné à vérifier la quantité de virus utilisée pour l'épreuve. La dose de virus utilisée pour la neutralisation (titre prévu de 100 DICT₅₀/50 µl) est diluée avec du MEM à 1/10, 1/100 et 1/1 000. 50 µl de chaque dilution sont placés dans au moins 8 puits et 50 µl de milieu sont ajoutés avant une incubation de 1 h à 37 °C. La suspension cellulaire est ajoutée de la même façon que pour les sérums éprouvés.

Témoin cellulaire : 150 µl de suspension cellulaire et 100 µl de MEM sont placés dans au moins 2 puits.

Témoin sérum positif : un sérum de titre connu en anticorps neutralisant le virus de la MA est utilisé. Cinq dilutions sont préparées de la même façon que pour les sérums testés : une dilution correspondant au titre du sérum, des dilutions 2 et 4 fois et des dilutions 2 et 4 fois moins (ce qui équivaut à T, T/2, T/4, 2T et 4T, T étant le titre du sérum, c'est-à-dire le sérum non dilué pour l'épreuve qualitative). À 50 µl des dilutions du sérum positif témoin, on ajoute 50 µl de la suspension virale contenant 100 DICT₅₀/50 µl. Les cellules sont incubées et la suspension cellulaire est ajoutée de la même façon que pour les sérums éprouvés.

Témoin sérum : il est destiné à vérifier l'absence d'effet cytotoxique des sérums. Les puits contenant 50 µl de chaque sérum sont incubés pendant une heure à 37 °C en présence de 50 µl de milieu. Puis, 150 µl de suspension cellulaire sont ajoutés, de la même façon que pour les sérums soumis à l'épreuve.

Témoin sérum négatif : ceci est fait comme pour les sérums soumis à l'épreuve.

- viii) *Lecture des résultats* : Un microscope à optique inversé (× 100) est utilisé pour examiner les cellules en vue de la recherche des effets cytotoxiques et cytopathogènes après 48 et 72 h. Les témoins doivent fournir les résultats suivants pour que les résultats soient considérés comme valables :

Témoin virus : le titre de la suspension virale doit être compris entre 30 et 300 DICT₅₀/50 µl.

Témoin cellules : le tapis cellulaire doit être intact.

Témoin sérum positif : le titre obtenu doit être égal au titre prévu, à une dilution près.

Témoins sérum : la recherche de l'ECP doit prendre en compte une éventuelle cytotoxicité.

Témoin sérum négatif : un ECP doit être présent.

- ix) Pour les sérums à tester, on peut avoir les résultats suivants :

Présence d'ECP dans les 3 puits : résultat négatif ;

Absence d'ECP dans les 3 puits au 3^e jour : résultat positif ;

Présence d'ECP dans 1 seul puits : résultat douteux ; à refaire ;

Petites plaques indiquant un ECP au 3^e jour : résultat douteux ; à refaire ;

Toxicité dans le témoin sérum et les puits du sérum éprouvé : résultat ininterprétable, l'épreuve doit être refaite (N.B. : le remplacement du milieu avec du nouveau milieu après 16 h d'incubation réduit la toxicité sans modifier le titre des anticorps).

- x) *Interprétation des résultats* : L'épreuve révèle la présence ou l'absence d'anticorps neutralisant le virus de la MA. Il est incapable de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés.

La technique décrite (neutralisation virale pendant 1 h à 37 °C) peut donner des résultats faussement négatifs ou des résultats faussement positifs. La sensibilité peut être augmentée (conduisant à moins de faux négatifs) en allongeant la durée du contact virus/sérum avant l'addition des cellules (24 h à 4 °C).

Une technique qualitative de ce type, employant du sérum non dilué (dilution finale du 1/2) peut donner dans certains cas des résultats faussement positifs à cause d'une neutralisation non spécifique du virus. Cette difficulté peut être résolue en utilisant la technique quantitative comme épreuve de confirmation (cf. ci-dessous).

- **Technique quantitative**

Elle est semblable à la technique qualitative, mais chaque sérum est étudié à la fois non dilué et après plusieurs dilutions. En fonction de la précision désirée, de l'objectif de l'étude et du titre attendu, deux puits sont utilisés pour chaque dilution de sérum et un plus ou moins grand nombre de dilutions. Dans l'idéal, on peut décrire une méthode pour des dilutions allant jusqu'à 1/256.

- i) Le complément des sérums à tester est inactivé par chauffage au bain-marie à 56 °C pendant 30 min ;
- ii) On ajoute 50 µl de milieu MEM aux puits A3 à A6 d'une microplaque de 96 puits pour culture cellulaire.
- iii) On ajoute 50 µl de sérum pur à tester aux puits A1 à A3 et on continue de la même façon dans les puits des rangées B, C, etc. pour les autres sérums à étudier ;
- iv) À l'aide d'une pipette multicanaux, on mélange le contenu des puits de la colonne 3, puis on transfère 50 µl dans la colonne 4 et ainsi de suite jusqu'à la colonne 6 ou davantage, en utilisant les mêmes embouts. On élimine 50 µl des puits de la 2^e colonne ;
- v) Les témoins sont préparés comme dans la technique qualitative ;
- vi) On ajoute 50 µl de milieu MEM dans les puits de la colonne 1 à la place de virus. Ces puits correspondent aux témoins sérums. La suspension virale est déposée dans tous les autres puits. Les manipulations suivantes sont les mêmes que celles de la technique qualitative ;
- vii) *Lecture des résultats* : Le titre neutralisant d'un sérum est exprimé par le dénominateur de la plus grande dilution initiale qui entraîne une neutralisation de l'ECP viral dans 50 % des puits. Est considérée comme positive une neutralisation à n'importe quelle dilution (même non dilué, ce qui correspond à une dilution finale de 1/2). Si le sérum est neutralisant uniquement en l'absence de dilution (avec multiplication virale et ECP à la dilution du demi et aux dilutions suivantes), il est souhaitable d'utiliser d'autres épreuves (ELISA ou l'agglutination au latex) pour confirmer le résultat, ou de demander un autre prélèvement sur le même animal, au moins 8 jours après le premier.

b) Méthode immuno-enzymatique (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

La sensibilité de la méthode immuno-enzymatique (ELISA) est généralement supérieure à celle de la séroneutralisation virale avec 1 h de neutralisation et sans complément. Des sérums faiblement positifs fournissent une meilleure réponse en neutralisation virale avec neutralisation pendant 24 h et d'autres avec l'épreuve ELISA.

Des kits de diagnostic utilisant une méthode ELISA sont disponibles dans le commerce, à base de technique indirecte ou par compétition pour la recherche des anticorps. Ils diffèrent par leur mode de

préparation de l'antigène, le conjugué ou le substrat, la durée de l'incubation et l'interprétation des résultats. Leur principal avantage est qu'ils permettent un traitement rapide de nombreux échantillons. Les manipulations peuvent être automatisées et les résultats analysés par ordinateur. Certains coffrets permettent de faire la différence entre des porcs infectés et des porcs vaccinés à l'aide d'un vaccin déléte (6, 21, 22). Par ailleurs, des ELISA non commercialisés peuvent être utilisés (2, 18) à la condition qu'ils fournissent un résultat positif avec la dilution au 1/2 du sérum étalon international de l'OIE (sensibilité minimale pour les échanges internationaux). Il est recommandé d'utiliser un coffret ou une technique interne qui a été validée sur cette norme par un contrôle de qualité effectué par un laboratoire indépendant. Un protocole valable pour la totalité des anticorps dirigé contre le virus est présenté ci-dessous (18) :

- **Préparation de l'antigène**

- i) Une lignée de cellules sensibles au virus pseudorabique est utilisée (par ex. PK-15 ou cellules de testicule de fœtus de porc). Elle doit être exempte de virus exogènes tels que le virus de la diarrhée virale bovine. Les cellules doivent être séparées etensemencées dans des fioles de 75 cm² la veille de l'inoculation. Un milieu adapté tel que le MEM, sans sérum, est utilisé pour recouvrir les cultures.
- ii) Les fioles contenant le virus et les fioles témoins qui en sont dépourvues sont traitées en parallèle tout au long de la procédure. Une souche adaptée et bien caractérisée de virus pseudorabique est utilisée, par ex. la souche Kojnock. Lorsqu'un tapis cellulaire confluent s'est constitué (environ 24 h après l'ensemencement), on procède à son inoculation avec 10⁸ DICT₅₀ de virus pseudorabique dans 5 ml de milieu de culture ; 5 ml de milieu (dépourvu de virus) sont versés dans les fioles témoins. Les cultures sont soumises au phénomène d'adsorption pendant 30 min à 37 °C, puis recouverte avec 20 ml de milieu.
- iii) Dès l'apparition de l'ECP, le surnageant est éliminé et 4 ml de KCl (solution 4 mM) ainsi que des microbilles en verre sont ajoutés. Les fioles sont agitées doucement pour détacher les cellules.
- iv) Les cellules sont lavées en effectuant 3 centrifugations successives à 770 g dans une solution de KCl 4 mM. La pastille est remise en suspension dans du KCl 4 mM avec 0,2 % de Triton X-100 (1 ml par fiole) en appliquant 60 coups d'homogénéisateur en verre.
- v) L'homogénat cellulaire est déposé en couche sur sucrose 0,25 mM dans du KCl 4 mM et centrifugé pendant 10 min à 770 g.
- vi) La pastille est remise en suspension dans du tampon de dilution de l'antigène, pH 9,6 (0,1 M Tris, 2 mM EDTA, 0,15 mM NaCl) à une dilution de 1/50 par rapport au volume du milieu de culture initial. On peut alors la stocker en petites fractions aliquotées à –70 °C. Sous cette forme, l'antigène est stable pendant 2 ans.

- **Plaques de microtitrage**

- i) L'antigène viral et l'antigène témoin (sans virus) sont dilués dans un tampon de dilution, pH 9,6 (voir ci-dessus) à une dilution préétablie par un titrage en échiquier.
- ii) 200 µl d'antigène sont distribués dans chacune des cupules des plaques pour ELISA à 96 cupules, en tapissant une rangée sur deux avec de l'antigène viral et de l'antigène témoin. L'incubation doit durer 18 h à 4 °C.
- iii) Les plaques sont lavées 3 fois avec la solution de lavage (Tween 20, 0,5 ml/litre).
- iv) Les plaques sensibilisées sont stockées à –20 °C ou –70 °C. Elles sont stables pendant plusieurs mois.

- **Protocole**

- i) Les échantillons de sérum à tester sont dilués à 1/30 dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS)/Tween, pH 7,2 (137 mM NaCl, 9,5 mM tampon phosphate, 0,5 ml/litre de Tween 20).
- ii) Les échantillons dilués sont ajoutés aux puits tapissés d'antigène viral et d'antigène témoin et incubés à 37 °C pendant 30 min.
- iii) Les plaques sont lavées 3 fois avec la solution de lavage (0,5 ml/litre de Tween 20).
- iv) Le complexe protéine A/peroxydase est ajouté dans chaque puits à une dilution prédéterminée dans un tampon PBS/Tween, pH 7,2 (voir ci-dessus), auquel est ajoutée de la fraction V d'albumine de sérum bovin (10 g/litre), et les plaques sont incubées à 37 °C pendant 30 min.

- v) Les plaques sont lavées 3 fois avec la solution de lavage (0,5 ml/litre de Tween 20).
- vi) Un mélange approprié de chromogène/substrat tel que la tetraméthylbenzidine (TMB)/peroxyde d'hydrogène, est ajouté à chaque plaque.
- vii) La réaction est stoppée en ajoutant 2 M d'acide sulfurique. L'absorbance est lue à 492 nm.

Les résultats des plaques doivent être validés à l'aide de sérums témoins négatif et positif. Il est également recommandé d'utiliser un sérum faiblement positif ayant un niveau d'anticorps semblable à celui du sérum étalon international de l'OIE à la dilution du 1/2. Pour plus de détails, voir la référence 18 et le Chapitre 1.1.4., « Principes de la validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses ». Les kits ELISA doivent également être validés dans les conditions de leur emploi.

Les coffrets ELISA sont utilisables pour les sérums mais aussi pour les disques de papier filtre ayant reçu un peu de sang provenant d'une veine superficielle. Cette technique de prélèvement se révèle très commode pour recueillir du sang chez un grand nombre de porcs (3, 19). Les disques sont laissés sécher à l'air avant envoi au laboratoire.

Des exigences pour la détection d'anticorps gE par ELISA chez les porcs envoyés à l'abattoir dans des zones indemnes de la maladie d'Aujeszky ont été définies par différentes autorités sanitaires. Le *Code sanitaire pour les animaux terrestres* précise les circonstances dans lesquelles les épreuves spécifiques pour la détection des gE doivent être utilisées. Ces épreuves peuvent également être réalisées sur disques de papier filtre.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

La maîtrise de l'infection peut être fondée sur l'utilisation de vaccins à virus atténué ou inactivé. En outre, à ces vaccins conventionnels se sont ajoutés des vaccins issus de la recombinaison génétique ou par des vaccins utilisant une souche vaccinale dont certains gènes ont été naturellement « délétés ». Ces vaccins, quelquefois appelés vaccins « marqueurs » sont produits à partir de virus qui n'expriment pas certaines glycoprotéines (le plus fréquemment gE, bien que des vaccins « délétés » gG ou gC aient été également décrits¹). Au moins un vaccin commercialisé présente une double délétion. Ces vaccins marqueurs dont la souche virale a subi la délétion d'un ou plusieurs gène(s) ont un avantage certain par rapport aux vaccins conventionnels à base de particules virales entières à savoir qu'ils permettent de distinguer les porcs vaccinés non infectés des porcs vaccinés et infectés. Cette différenciation est possible en recherchant les anticorps spécifiques des protéines codées par les gènes absents des souches vaccinales utilisées ; ces anticorps ne sont donc pas induits chez les porcs vaccinés avec de tels vaccins et non infectés alors qu'ils sont induits et détectés après une infection naturelle. Ainsi, dans les pays où la prévalence de l'infection est significative, l'utilisation de ces vaccins marqueurs est une des composantes importantes des plans d'éradication mis en place. Les exigences en matière de fabrication des vaccins à virus atténués ou inactivés sont définies dans le présent chapitre. Pour les vaccins marqueurs, les épreuves de diagnostic sérologique devront inclure la recherche des anticorps spécifiques des protéines des gènes absents des vaccins dits délétés.

Des lignes directrices pour la production de vaccins vétérinaires sont précisées dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices précisées dans le présent chapitre et dans le Chapitre 1.1.8. sont essentiellement de portée générale et peuvent être complétées par des exigences nationales ou régionales.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Les vaccins sont produits selon un système de lots de semence. Ainsi, un lot de semence primaire est préparé à partir d'une souche appropriée du virus de la maladie d'Aujeszky. Différentes origines de souches virales peuvent être utilisées pour la production des vaccins. L'antigène d'un vaccin à virus inactivé peut être dérivé de l'une de ces souches virales pleinement virulentes ou de souche virale naturellement délétée comme la souche Bucarest ou de souche virale à gène délété obtenue par recombinaison de l'ADN. Les vaccins conventionnels à virus vivant atténué ou les vaccins de nouvelle génération obtenus par

¹ La nomenclature des gènes a été changée il y a quelques années, mais l'ancienne désignation est encore retrouvée dans la littérature. L'ancienne et la nouvelle nomenclature sont : g11 – gB; g111 = gC; gp50 = gD; g1 = gE; gX = gG; gp63 = gI.

recombinaison génétique peuvent être fabriqués à partir de souches virales comme la souche Bartha (8, 9, 11, 15, 17 23, 27) ou à partir de souches dérivées d'isolats du terrain comme la souche NIA-3.

Afin de pouvoir distinguer les animaux vaccinés de ceux qui sont infectés, il est recommandé d'utiliser des souches déléetées.

Des tests d'identité (fondés soit sur l'utilisation d'anticorps fluorescents, soit sur une technique de neutralisation [virus variable/sérum constant] ou sur toute autre méthode appropriée) doivent être réalisés sur le lot de semence primaire.

Le lot de semence primaire doit être indemne de mycoplasmes, de bactéries, de champignons, de virus cytopathogènes ou hémadsorbants, de parvovirus porcin, de pestivirus ovins et bovins cytopathogènes ou non-cytopathogènes et d'autres contaminants comme le circovirus. Ces contaminants doivent être recherchés par isolement sur culture, par des techniques d'immunofluorescence ou d'autres techniques comme la PCR.

b) Méthode de culture

La plupart des cellules utilisées pour la multiplication du virus de la maladie d'Aujeszky sont issues de lignée cellulaire, comme la lignée PK-15. Un lot de semence cellulaire primaire (SCP) est produit à un niveau de passage bien déterminé. Le SCP et le niveau de passage le plus élevé (SCP x n) utilisé pour la préparation d'un produit biologique sont spécifiés dans des procédures de production. Les deux niveaux de passage cellulaire (SCP et SCP x n) sont contrôlés en mettant en œuvre un ensemble de techniques permettant de caractériser la lignée cellulaire et de garantir l'absence d'agent contaminant. Les agents contaminants à rechercher sont généralement décrits dans des monographies et/ou des lignes directrices (Pharmacopée Européenne, US Code of Federal Regulations, Lignes directrices UE, etc.). La liste des contaminants à détecter est en général basée sur une analyse de risque et dépend de l'historique de la souche virale et des cellules sur lesquelles la souche vaccinale a été isolée et cultivée.

Des tests d'identité d'espèces doivent être réalisés sur le lot de semence cellulaire primaire ; un minimum de 50 cellules en état de mitose devrait être examiné à la fois pour le lot de semence cellulaire primaire et le passage le plus élevé (SCP x n). Le nombre modal du SCP x n ne doit pas excéder de 15 % le nombre modal du SCP. Tout chromosome marqueur spécifique du SCP doit aussi être présent au plus haut niveau de passage.

S'il y a évidence que la lignée cellulaire peut être associée avec l'induction de tumeurs chez les espèces pour lesquelles le vaccin est indiqué, des tests de tumorigénicité et d'oncogénicité doivent être réalisés sur la lignée cellulaire.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

i) Pureté

Le lot de semence viral primaire doit être indemne de mycoplasmes, de bactéries, de champignons, de virus cytopathogènes ou hémadsorbant, de parvovirus porcin, de pestivirus ovins et bovins cytopathogènes et non cytopathogènes et d'autres agents contaminants tels que le circovirus ; ces contrôles doivent être réalisés par isolement sur culture, par des techniques d'immunofluorescence ou d'autres telles que la PCR.

ii) Tests de stabilité

Des tests doivent être réalisés pour vérifier la durée de péremption proposée par le fabricant. Ces tests doivent toujours être fondés sur des études en temps réel ; ces tests doivent être réalisés sur un nombre suffisant de lots (au moins 3) produits selon les procédés de fabrication décrits et sur les produits finis conservés dans le container final. Ces contrôles doivent inclure normalement des essais de stabilité biologiques et physico-chimiques. Le fabricant doit fournir les résultats des essais qui démontrent la validité de la durée de péremption qui est proposée et quelles que soient les conditions de stockage proposées. Habituellement, la durée de péremption proposée correspond à la période pour laquelle le produit est considéré comme stable, diminuée de 3 mois.

iii) Tests d'innocuité

Les réactions locales et générales doivent être étudiées. Quand un vaccin à virus atténué est utilisé, il est nécessaire d'évaluer de manière distincte les propriétés d'innocuité spécifiques de la souche vaccinale de celles du produit fini si celui-ci comprend un adjuvant de l'immunité.

Il convient d'utiliser des critères objectifs et quantifiables pour rechercher et mesurer les réactions indésirable ; ceux-ci devraient comprendre les variations de température, les gains de poids, la taille

des portées, les performances de reproduction, etc. des lots vaccinés et des lots témoins. Les tests doivent être réalisés en administrant le vaccin aux porcs à la dose et par chacune des voies recommandées.

En général, l'innocuité est testée, au départ, dans des conditions expérimentales. Quand les résultats de ces essais préliminaires sont connus, il devient alors nécessaire de réaliser des essais complémentaires sur un nombre plus élevé d'animaux afin d'évaluer l'innocuité du vaccin dans des conditions du terrain.

- **Essais de laboratoire**

Tous les tests doivent être réalisés sur des porcs qui n'ont pas d'anticorps contre la maladie d'Aujeszky ou contre une sous-unité du virus.

- a. Effets généraux**

- 1. Vaccins à virus vivant atténué**

Des inoculations intra-nasales et une vaccination de porcs âgés de 3 à 5 jours sont très utiles pour évaluer le degré d'innocuité de la souche vaccinale. 5 porcelets au moins doivent être utilisés.

Il est aussi essentiel d'évaluer les propriétés d'un vaccin, particulièrement ceux à virus vivant atténué, chez l'espèce cible et dans les conditions habituelles d'utilisation, à l'âge le moins élevé tel qu'indiqué ; par exemple, le porc charcutier est vacciné en général entre 8 et 12 semaines ; les essais doivent également être réalisés chez la truie gestante lorsque le fabricant revendique cette indication et qu'elle est autorisée. Aucun signe clinique incluant une élévation significative de la température rectale ne devrait être observé après la vaccination (les données doivent être enregistrées avant la vaccination, 6 h, 24 h et 48 h après, puis quotidiennement pendant la période d'observation). Ces essais doivent être réalisés sur, au moins, 10 porcs vaccinés, avec des porcs non vaccinés utilisés comme témoins.

La réversion de virulence, après plusieurs passages en série, doit également être examinée. Une première vaccination est pratiquée par voie intra-nasale. Des séries d'au moins 5 passages sont réalisées chez le porcelet. Pas moins de 2 porcelets sensibles doivent être utilisés à chaque passage.

Le but de ces essais est de tester la stabilité génétique des souches vaccinales vivantes. Ces tests sont moins nécessaires quand il s'agit d'une souche obtenue par recombinaison génétique, tout particulièrement lorsqu'une délétion de gènes a été réalisée.

Il est recommandé de rechercher une éventuelle excrétion de la souche vaccinale. Dans ce but, pas moins de 14 porcelets, âgés de 3 à 4 semaines chacun, sont vaccinés avec une dose, par la voie recommandée et au site d'injection recommandé (à l'exception des vaccins administrés par voie nasale). Quatre porcelets témoins non vaccinés sont inclus dans l'essai. Des recherches de virus sont réalisées en utilisant des techniques sensibles à partir des sécrétions nasales et orales des porcelets vaccinés et témoins ; ainsi, des écouvillonnages oraux et nasaux sont-ils effectués chaque jour, du jour précédant la vaccination jusqu'au 10^e jour après la vaccination. L'utilisation de souches vaccinales qui seraient isolées des sécrétions orales/nasales récoltées chez les porcs vaccinés par voie parentérale n'est pas recommandée.

La capacité d'une souche vaccinale du virus de la maladie d'Aujeszky à diffuser d'un porc vacciné à un porc non vacciné (diffusibilité) doit être explorée en utilisant la voie d'administration recommandée qui présente le risque le plus élevé de diffusibilité (excepté pour les vaccins administrés par voie nasale). Une répétition des essais (4 fois) est nécessaire dans la mesure où cet événement est difficile à mettre en évidence. Quatre porcelets devraient être utilisés à chaque essai et mis en contact, un jour après la vaccination, avec 2 porcelets non vaccinés. Il peut s'avérer nécessaire d'évaluer la diffusibilité de la souche vaccinale chez des espèces non cibles qui peuvent être sensibles à la souche vaccinale.

Les souches vaccinales à virus vivant atténué sont testées pour évaluer les possibles effets généraux induits en inoculant 10 fois la dose indiquée dans les conditions de vaccination habituelles à des porcelets âgés de 5 à 10 jours. L'administration d'une dose supérieure augmente la probabilité de détecter des réactions moins facilement identifiées dans des conditions normales d'utilisation. De telles réactions peuvent être observées quand un grand nombre d'animaux sont vaccinés. Lorsque les vaccins sont administrés par voie nasale, le fabricant doit clairement signaler que le vaccin diffusera des porcs vaccinés aux porcs non vaccinés.

- 2. Vaccins à virus inactivé**

Il est essentiel de tester les vaccins à virus inactivé chez l'espèce cible dans des conditions normales d'utilisation tant chez les porcs charcutiers que chez les truies lorsque cette indication est revendiquée par le fabricant et autorisée (26). Comme il est indiqué précédemment, il est essentiel d'utiliser des critères objectifs et quantifiables pour détecter et mesurer des effets indésirables tels qu'une modification de la température corporelle, les performances pondérales, la taille de la portée, les performances de reproduction, etc. Ces mesures doivent être réalisées sur des porcs vaccinés et

témoins. Les tests doivent être mis en œuvre en injectant le vaccin aux différentes catégories de porcs pour lesquelles des indications existent, selon la dose indiquée et par chaque voie recommandée.

Les porcs ou les truies sont habituellement observés jusqu'à ce que toute réaction éventuelle due au vaccin soit écartée. La période d'observation ne doit pas être inférieure à 14 jours à compter du jour de l'administration. Cette période peut être étendue quand, par exemple, le vaccin est utilisé chez les truies gestantes et il est nécessaire d'évaluer les effets possibles du vaccin sur les performances de reproduction. Dans ce cas, la période d'observation recouvre toute la durée de gestation.

Les autorités compétentes requièrent généralement une vaccination avec une double dose pour que la probabilité de détecter des réactions adverses, à la limite de détectabilité dans des conditions normales d'utilisation, soit augmentée.

b. Réactions locales

Les réactions locales sont souvent associées à la présence d'adjuvant dans la composition du vaccin à virus inactivé et tout particulièrement les adjuvants huileux (24). Cependant, quelques vaccins à virus vivant atténué peuvent également être composés de différents adjuvants modifiant ainsi ce qui a pu être observé par le passé.

Les réactions locales sont principalement de nature inflammatoire plus ou moins compliquée (nécrose ou suppuration) en fonction de la nature de l'adjuvant utilisé et des conditions d'asepsie lors de l'acte vaccinal. Les adjuvants huileux peuvent induire des réactions très diverses telles que la dégénérescence musculaire, des granulomes, une fibrose et un abcès. De plus, la nature de l'huile utilisée (l'intensité de la réaction est diminuée quand les huiles métabolisables sont utilisées dans la composition du vaccin), le type d'émulsion (eau/huile, huile/eau, eau/huile/eau) conditionnent l'importance de ces réactions. En conséquence, il est nécessaire d'observer le point d'injection non seulement par examen visuel externe, mais aussi en disséquant après abattage le site d'injection, tout particulièrement chez les porcs charcutiers.

- **Essais terrain**

Les essais terrain sont nécessaires pour évaluer l'innocuité du vaccin de la maladie d'Aujeszky chez un grand nombre de porcs ou de truies. En Europe (7), les tests doivent être réalisés sur chaque catégorie de porcs pour lesquels existent des indications vaccinales (truies, porcs charcutiers). Trois groupes d'au moins 20 porcs chacun sont utilisés avec un nombre de groupes de porcs témoins équivalent, chacun composé d'au moins 10 animaux. La température rectale de chaque animal est mesurée au moment de la vaccination et 24 et 48 h plus tard. À l'abattage, le site d'injection doit être examiné pour rechercher d'éventuelles réactions locales. Si le vaccin doit être utilisé chez les truies, les performances de reproduction doivent être enregistrées. Ces essais terrain complètent les études d'efficacité menées dans des conditions expérimentales, études d'efficacité qui doivent être corrélées aux études d'activité.

- iv) **Tests d'efficacité**

- **Essais en laboratoire**

Tous les essais doivent être réalisés sur des porcs qui n'ont pas d'anticorps contre le virus de la maladie d'Aujeszky ou contre une sous-unité du virus, excepté lorsque certains essais peuvent être réalisés sur des porcs nés de mères immunes et présentant dans leur sérum des anticorps passifs.

a. Évaluation de l'immunité passive

Pour évaluer l'efficacité des vaccins, il est important de pouvoir se placer dans des conditions proches de l'infection naturelle (1). L'infection par le virus de la maladie d'Aujeszky entraîne des pertes importantes chez les porcelets issus de mères non immunes. Ainsi, en vaccinant les truies, l'effet recherché est-il de protéger le porcelet au travers de l'immunité passive conférée par l'ingestion de colostrum immédiatement après la naissance. Par ailleurs, la vaccination peut prévenir les risques d'avortement post infectieux.

Afin de mesurer cette immunité passive et la protection conférée aux porcelets par la vaccination des truies, des modèles expérimentaux ont été élaborés. Les truies sont vaccinées conformément au protocole vaccinal en cours de gestation. Lorsque les porcelets sont âgés, par exemple, de 6 à 10 jours, ils reçoivent une épreuve virulente par voie nasale. Il est recommandé d'utiliser une souche titrée en doses létales 50 % (DL₅₀). Les porcelets devraient être inoculés avec 1 ml par voie nasale avec une souche titrant 10² DL₅₀ par ml. L'efficacité du vaccin est évaluée en comparant les signes cliniques, mais aussi la mortalité, induits chez les porcelets nés de truies non vaccinées et ceux observés chez les porcelets nés de mères vaccinées.

Une protection de 80 % au regard de la mortalité peut être observée chez les porcelets nés de truies vaccinées alors que 100 % des porcelets meurent dans les portées témoins. Afin que les résultats puissent être considérés comme significatifs, il est recommandé que, dans cet essai d'efficacité, 8 truies vaccinées et 4 truies témoins soient utilisées (les portées doivent être composées d'un nombre satisfaisant de porcelets).

b. Évaluation de l'immunité active

1. Protection clinique

Plusieurs critères peuvent être pris en considération pour mesurer l'immunité active stimulée par la vaccination des porcs. Généralement, les porcs sont vaccinés au début de la période d'engraissement, c'est-à-dire quand ils sont âgés de 9 à 12 semaines. Des études expérimentales sont conduites en éprouvant les porcs à la fin de la période d'engraissement quand ils pèsent de 80 à 90 kg.

En général, au moins quatre critères, tels que la température rectale, la perte de poids et les signes cliniques ainsi que la mortalité sont utilisés pour mesurer, après épreuve, la protection clinique des porcs vaccinés (5). Les titres en anticorps ont une faible valeur prédictive de l'efficacité des vaccins. La comparaison des pertes de poids entre les porcs vaccinés et témoins, constitue le paramètre le plus reproductible et pertinent quand les conditions d'épreuve sont bien normalisées. La mesure de la différence de croissance ou de perte de poids entre les deux groupes de porcs et ce, dans les 7 jours qui suivent l'épreuve (J0 et J7) est une excellente valeur prédictive de l'efficacité des vaccins (14). Des résultats significatifs peuvent être obtenus quand les performances pondérales sont comparées entre deux groupes (témoins et vaccinés) d'au moins 8 porcs chacun.

Pour l'épreuve, il est préférable d'utiliser un titre élevé de la souche virulente afin d'obtenir une différence plus marquée entre les porcs témoins et vaccinés. À la lumière des données acquises, on peut estimer qu'une souche virulente titrant au moins 10^6 DICT₅₀/ml, n'ayant pas été multipliée plus de 3 fois sur cellules primaires peut donner des résultats satisfaisants, mais un titre plus élevé ($10^{7.5}$ DICT₅₀/ml) est recommandé. La voie oro-nasale devrait être utilisée pour inoculer la souche d'épreuve sous un volume relativement élevé (≥ 4 ml).

Cette méthode d'évaluation des vaccins contre la maladie d'Aujeszky est maintenant bien validée et un index objectif peut être calculé pour mesurer l'efficacité d'un vaccin. Cet index, qui compare les pertes de poids relatives entre les porcs vaccinés et témoins, peut aussi être utilisé pour l'évaluation de l'activité dans le cadre de la libération des lots. Cependant, la valeur seuil de l'index déterminant le rejet ou l'acceptation du lot sera différente dans la mesure où les conditions d'épreuve ne sont pas identiques pour les essais d'efficacité ou d'activité. L'influence des anticorps d'origine maternelle acquis passivement sur l'efficacité d'un vaccin doit également être évaluée.

2. Excrétion virale

Par ailleurs, il est important que les vaccins puissent prévenir ou au moins limiter l'excrétion virale chez les porcs vaccinés et infectés (13, 20, 25). Quand un programme de lutte contre la maladie d'Aujeszky est fondé sur une vaccination de masse, il est essentiel de choisir les vaccins ou le schéma vaccinal qui limitent au mieux la réplication du virus virulent chez les porcs infectés. De nombreux essais ont été réalisés pour comparer les vaccins sur cette base.

Généralement, les porcs sont vaccinés et éprouvés à différentes périodes. Il est préférable, même si de tels essais durent plus longtemps, d'infecter les porcs à la fin de la période d'engraissement. Afin de mesurer l'excrétion virale, des écouvillonnages nasaux (jusqu'à 10 cm de profondeur dans la cavité nasale) sont réalisés quotidiennement sur chaque porc, du jour qui précède l'épreuve, jusqu'au 12^e jour au moins après l'épreuve. Les écouvillons peuvent être pesés avant le prélèvement et immédiatement après, pour calculer le poids exact du mucus récolté. Du milieu est alors ajouté dans chaque tube contenant l'écouvillon. Le virus est titré dans le milieu après congélation et décongélation.

Différents index peuvent être utilisés pour exprimer la quantité du virus virulent excrété par les porcs en prenant en considération la durée et le niveau d'excrétion virale ainsi que le nombre de porcs excréteur le virus virulent.

3. Durée d'immunité

Il est recommandé que toute indication revendiquée relative au développement et à la durée de l'immunité soit démontrée par des données expérimentales. L'évaluation de la durée d'immunité peut être fondée sur des infections expérimentales ou, lorsque cela est possible, sur des tests immunologiques et sérologiques.

- **Essais sur le terrain**

D'un point de vue général, il est extrêmement difficile d'évaluer l'efficacité de vaccins dans une population animale sur le terrain. Dans ce but, il serait nécessaire de vacciner les animaux en l'absence d'infection, puis d'attendre le moment de l'infection et de comparer les effets de l'infection chez les animaux vaccinés (ou chez les jeunes issus de mères vaccinées) avec ceux observés chez des animaux témoins du même âge, élevés dans le même bâtiment et du même lot que les animaux vaccinés (ou ceux protégés passivement). Comme toutes ces conditions sont difficiles à remplir sur le terrain, les essais terrains sont certainement plus appropriés pour évaluer l'innocuité plutôt que l'efficacité.

2. Méthode de fabrication

Seul, le lot de semence virale primaire qui a été contrôlé et considéré comme pur, dépourvu de pouvoir pathogène résiduel et immunogène, peut être utilisé comme semence d'inoculation pour la fabrication d'un vaccin. Les cellules du lot de semence cellulaire primaire sont multipliées dans un milieu de culture approprié. Tous les lots de vaccins doivent être produits à partir des cellules multipliées entre le premier et le 20^e passage du lot de semence cellulaire primaire.

3. Contrôles en cours de fabrication

Il est nécessaire de mettre en œuvre des tests à chaque étape critique du processus de fabrication. Les contrôles sont également réalisés sur les produits intermédiaires afin de vérifier la constance du processus de production et la constance de qualité du produit fini.

4. Contrôles du produit fini

Il est essentiel de distinguer les tests qui sont mis en œuvre, en routine, afin de libérer les lots de produits finis de ceux qui sont réalisés pour définir les propriétés biologiques d'un vaccin. Les essais mis en œuvre dans le cadre de la libération d'un lot ne sont pas les mêmes que ceux réalisés une seule fois pour déterminer l'innocuité et l'efficacité d'un vaccin. Les contrôles de libération de lots sont toujours des essais de courte durée, aussi peu coûteux que possible, et pas toujours réalisés chez les porcs. Leur but est essentiellement d'attester la reproductibilité de la qualité du produit fini qui doit être conforme aux critères de qualité définis dans le dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché.

a) Stérilité et test de pureté

Des tests doivent être mis en œuvre pour démontrer la stérilité et l'absence de contamination (voir le Chapitre 1.1.9.). Chaque lot de vaccin contre la MA doit être testé pour démontrer l'absence de contaminants viraux. En utilisant une quantité minimale d'un antisérum monospécifique, la souche virale vivante vaccinale est neutralisée et inoculée à des cultures cellulaires réputées sensibles aux virus pathogènes pour le porc. Aucun ECP ni agent hémasorbant ne devrait être mis en évidence. Les vaccins doivent être indemnes de pestivirus.

b) Inactivation

Pour les vaccins à virus inactivé, l'inactivation doit être vérifiée en réalisant deux passages sur les mêmes types de cellules que celles utilisées pour la production du vaccin. Les tests peuvent être réalisés en vaccinant des animaux sensibles comme le lapin.

c) Identité

Si nécessaire, un test spécifique d'identification de la souche virale vaccinale devrait être mis en œuvre.

d) Innocuité

L'innocuité de vaccins à virus vivant est évaluée en administrant 10 doses du vaccin reconstitué par la voie indiquée sur la notice d'utilisation à, au moins, deux porcelets de l'âge minimum recommandé pour la vaccination et dont le sérum est dépourvu d'anticorps contre la maladie d'Aujeszky. Deux porcelets de même origine et de même âge sont utilisés comme témoins. Aucune réaction anormale locale ou générale ne devrait être observée. La courbe de poids des porcelets vaccinés ne doit pas être significativement différente de celle des témoins.

Pour les vaccins à virus inactivé, l'innocuité est évaluée en injectant 2 doses aux porcelets selon les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

e) Activité

L'activité d'un vaccin doit être démontrée selon une méthode appropriée, les résultats obtenus devant être corrélés avec les tests d'efficacité décrits précédemment.

Pour ce type de test, l'étape la plus difficile est de définir un seuil d'acceptabilité pour la libération ou le rejet du lot selon les résultats obtenus.

Les épreuves de titrage de virus ou d'antigène devraient être réalisées sur au moins 3 lots différents. Le titre viral du vaccin doit être déterminé et ne doit pas normalement être supérieur au 10^e du titre pour lequel l'innocuité du vaccin a été démontrée et ne doit pas être inférieur au titre minimal de libération du lot.

f) Agents de conservation

Si aucun conservateur n'est incorporé dans le produit fini, le fabricant doit démontrer que le produit reste conforme pendant la période recommandée d'utilisation après ouverture du flacon.

L'efficacité des conservateurs dans les flacons multi-dose doit être démontrée. La concentration du conservateur dans le flacon du produit fini et son maintien tout au long de la durée de vie doit être vérifiée.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Toute information sur des réactions indésirables possibles induites par le vaccin doit être donnée. Tout risque potentiel pour la santé publique si l'utilisateur s'administre accidentellement une petite quantité du produit doit être indiqué. Le fabricant devrait indiquer toutes les conditions d'utilisation du vaccin : mélange, reconstitution, stockage, asepsie, longueur d'aiguille, voie d'administration et statut sanitaire des animaux vaccinés.

5. Contrôles sur le produit fini

a) Innocuité

Chaque lot de vaccin doit être testé pour l'innocuité comme décrit dans la section c.4.d.

b) Activité

Chaque lot de vaccin doit être testé pour l'activité comme décrit dans la section c.4.e.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANDRIES K., Pensaert M. B. & VANDEPUTTE J. (1978). Effect of experimental infection with pseudorabies (Aujeszky's disease) virus on pigs with maternal immunity from vaccinated sows. *Am. J. Vet. Res.*, **39**, 1282–1285.
2. BANKS M. (1983). Rapid ELISA for Aujeszky's disease eradication. *Vet. Rec.*, **113**, 94–95.
3. BANKS M. (1985). Detection of antibodies to Aujeszky's disease virus in whole blood by ELISA-disc. *J. Virol. Methods*, **12**, 41–45.
4. BITSCH V. & EKILDSSEN M. (1982). Complement-dependent neutralization of Aujeszky's disease virus by antibody. In: Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science 17. Aujeszky's Disease, Wittmann G. & Hall S.A., eds. Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands, 41.
5. DE LEEUW P.W. & VAN OIRSCHOT J.T. (1985). Vaccines against Aujeszky's disease: evaluation of their efficacy under standardized laboratory conditions. *Vet. Q.*, **7**, 780–786.
6. ELOIT M., FARGEAUD D., VANNIER P. & TOMA B. (1989). Development of an ELISA to differentiate between animals either vaccinated with or infected by Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.*, **124**, 91–94.
7. EUROPEAN PHARMACOPOEIA, THIRD EDITION (1997). Monograph 0744: Vaccinum morbi Aujeszky ad suem inactivatum (inactivated Aujeszky's disease vaccine for pigs). Monograph 0745: Vaccinum morbi Aujeszky ad suem vivum cryodesiccatum ad usum parenterale (Freeze-dried Aujeszky disease live vaccine for pigs for parenteral administration). Council of Europe, Strasbourg, France.

8. KIT S. (1988). Safety and efficacy of genetically engineered Aujeszky's disease vaccines. *In: Vaccination and Control of Aujeszky's Disease*, Van Oirschot J.T., ed. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 45–55.
9. MARCHIOLI C.C., YANCEY R.J., WARDLEY R.C., THOMSEN D.R. & POST L.E. (1987). A vaccine strain of pseudorabies virus with deletions in the thymidine kinase and glycoprotein genes. *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 1577–1583.
10. MENGELING W.L., LAGER K.M., VOLZ D.M. & BROCKMEIER S.L. (1992). Effect of various vaccination procedures on shedding, latency and reactivation of attenuated and virulent pseudorabies virus in swine. *Am. J. Vet. Res.*, **53** (11), 2164–2173.
11. MCFERRAN J.B. & DOW C. (1975). Studies on immunisation of pigs with the Bartha strain of Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.*, **19**, 17–22.
12. MOENNING V., WOLDESENBERT P., FEY H.R., LIESS B., DOPOTKA H.D. & BEHRENS F. (1982). Comparative evaluation of ELISA and neutralization test for the diagnosis of Aujeszky's disease. *In: Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science 17. Aujeszky's Disease*, Wittmann G. & Hall S.A., eds. Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands, 51.
13. PENSART M.B., DE SMET K. & DE WAELE K. (1990). Extent and duration of virulent virus excretion upon challenge of pigs vaccinated with different glycoprotein-deleted Aujeszky's disease vaccines. *Vet. Microbiol.*, **22**, 107–117.
14. STELLMANN C., VANNIER P., CHAPPUIS G., BRUN A., DAUVERGNE M., FARGEAUD D., BUGAUD M. & COLSON X. (1989). The potency testing of pseudorabies vaccines in pigs. A proposal for a quantitative criterion and a minimum requirement. *J. Biol. Stand.*, **17**, 17–27.
15. TOMA B. (1979). Obtention et caractérisation d'une souche thermosensible de virus de la maladie d'Aujeszky (souche ALFORT 26). *Rec. Med. Vet.*, **155**, 131–137.
16. TOMA B. (1982). Serological diagnosis of Aujeszky's disease using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *In: Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science 17. Aujeszky's Disease*, Wittmann G. & Hall S.A., eds. Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands, 65.
17. TOMA B., BRUN A., CHAPPUIS G. & TERRE J. (1979). Propriétés biologiques d'une souche thermosensible (ALFORT 26) de virus de la maladie d'Aujeszky. *Rec. Med. Vet.*, **155**, 245–252.
18. TOMA B. & ELOIT M. (1986). Pseudorabies virus antibodies (Aujeszky's disease). *In: Methods of Enzymatic Analysis X, Antigens and Antibodies 1*, Bergmeyer V.C.H., ed. D-6940 Weinheim, Germany.
19. TOMA B., ELOIT M. & TILMANT P. (1986). Sérodiagnostic de la maladie d'Aujeszky: utilisation de prélèvements de sang sur papier filtre. *Rec. Med. Vet.*, **162**, 1111–1117.
20. VAN OIRSCHOT J.T. & GIELKENS A.L.J. (1984). Intranasal vaccination of pigs against pseudorabies: absence of vaccinal virus latency and failure to prevent latency of virulent virus. *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 2099–2103.
21. VAN OIRSCHOT J.T. & OEI H.L. (1989). Comparison of two ELISAs for detecting antibodies to glycoprotein I of Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.*, **125**, 63–64.
22. VAN OIRSCHOT J.T., RZIHA M.J., MOONEN, P.J.L.M., POL J.M. & VAN ZAANE D. (1986). Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive immunoassay. *J. Gen. Virol.*, **67**, 1179–1182.
23. VAN OIRSCHOT J.T., TERPSTRA C., MOORMANN R.J.M., BERNIS A.J.M. & GIELKENS A.L.J. (1990). Safety of an Aujeszky's disease vaccine based on deletion mutant strain 783 which does not express thymidine kinase and glycoprotein I. *Vet. Rec.*, **127**, 443–446.
24. VANNIER P. (1986). Immunisation de porcs charcutiers contre la maladie d'Aujeszky avec deux vaccins à adjuvants huileux. Etude des réactions locales. *Rec. Med. Vet.*, **162**, 37–44.
25. VANNIER P., HUTET E., BOURGUEIL E. & CARIOLET R. (1991). Level of virulent virus excreted by infected pigs previously vaccinated with different glycoprotein deleted Aujeszky's disease vaccines. *Vet. Microbiol.*, **29**, 213–223.

26. VANNIER P., TILLON J.P., TOMA B., DELAGNEAU J.F., LOQUERIE R. & PRUNET P. (1976). Protection conférée au porc par un nouveau vaccin huileux à virus inactivé contre la maladie d'Aujeszky. Conséquences pratiques. *J. Rech. Porc Fr.*, 281–290.
27. VISSER N. & LUTTICKEN D. (1988). Experiences with a gl-TK-modified live pseudorabies virus vaccine: strain Begonia. *In: Vaccination and Control of Aujeszky's Disease*, Van Oirschot J.T., ed. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 37–44.
28. WITTMANN G. & LEITZKE I.I. (1985). Die Beeinflussung des Aujeszkyvirus-neutralizationstests durch verschiedene Testbedingungen. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, **92**, 262–266.
29. YOON H.-A., EO S.-K., ALEYAS A.G., CHA S.-Y., LEE J.-H., CHAE J.-S., JANG H.-K., CHO J.-G. & SONG H.-J. (2006). Investigation of pseudorabies virus latency in nervous tissues of seropositive pigs exposed to field strain. *J. Vet Med. Sci.*, 68 (2), 143–148.

*
* *

N.B. : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la maladie d'Aujeszky (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

FIÈVRE CATARRHALE DU MOUTON (« BLUETONGUE »)

RÉSUMÉ

La fièvre catarrhale du mouton (FCO ou « bluetongue ») est une maladie infectieuse qui affecte les moutons, les chèvres, les bovins, les buffles, les cerfs et la plupart des antilopes africaines et autres Artiodactyles comme hôtes vertébrés. Il s'agit d'une infection non contagieuse, transmise par des insectes (arbovirose) qui est asymptomatique chez la grande majorité des animaux infectés mais peut entraîner des formes mortelles chez un pourcentage variable de moutons, cerfs et ruminants sauvages infectés. Bien que les bovins ne manifestent pas de signes cliniques, ils jouent un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie en raison d'une virémie de longue durée. Les signes cliniques varient en intensité non seulement selon les espèces, mais aussi selon les races et même au sein d'un troupeau. Les signes cliniques provoqués par l'infection, quand ils sont présents sont une réaction fébrile associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire et comprennent de l'hyperhémie et de la congestion, de l'œdème de la face et des hémorragies et des érosions des muqueuses. Cependant, dans les formes bénignes seules sont observés une virémie transitoire, du jetage et du larmolement. Dans les formes très sévères, la langue peut montrer des lésions importantes de congestion, devient œdémateuse et sort de la bouche, ou devient cyanosée. La congestion active peut s'étendre à d'autres parties du corps comme le bourrelet du sabot, l'aîne, la région axillaire et le périnée. Une dégénérescence sévère des muscles squelettiques et cardiaques est souvent associée. L'inflammation cutanée peut provoquer une chute de la laine. Les moutons se mettent à boiter à cause de l'inflammation des bourrelets coronaires du sabot et d'une myopathie des muscles striés. Une maladie sévère similaire observée chez les ruminants sauvages est due à un autre virus : celui de la maladie épizootique hémorragique du cerf (EHDV pour Epizootic haemorrhagic disease of deer virus) qui, comme le virus de la fièvre catarrhale du mouton appartient au genre Orbivirus mais est classé dans un autre séro groupe. Le virus EHD peut parfois provoquer des signes cliniques qui sont proches de ceux de la FCO.

Identification de l'agent pathogène : le virus de la fièvre catarrhale du mouton (BTV pour Bluetongue Virus) appartient au genre Orbivirus au sein de la famille des Reoviridae. Vingt sérogroupes sont décrits au sein de ce genre. Le séro groupe BT contient 24 sérotypes. Ces différents sérogroupes d'Orbivirus sont différenciés à l'aide d'épreuves immunologiques qui détectent des protéines virales conservées chez les virus d'un même séro groupe. La plupart des sérogroupes sont distincts sur un plan antigénique, mais il existe de nombreuses réactions croisées entre les virus de sérotypes apparentés comme c'est le cas pour les sérogroupes BT et EHD. Le sérotype de chaque virus au sein d'un séro groupe est défini à l'aide des techniques de neutralisation virale. Les particules du BTV sont constituées par 2 capsides icosaédriques contenant l'ARN viral double brin. La capside externe est composée de 2 protéines dont l'une, VP2, est le support principal du déterminisme antigénique de la spécificité de sérotype. La capside interne (« core » ou noyau) est composée de 2 protéines majeures et de 3 mineures ainsi que de 10 segments d'ARN. VP7 est la protéine majeure de la capside interne et possède les déterminants antigéniques spécifiques de groupe. L'identification du virus nécessite l'isolement et la multiplication du virus sur œufs embryonnés, culture de cellules ou l'inoculation à des ruminants sensibles, puis l'utilisation de tests d'identification du séro groupe et du sérotype. L'utilisation de la technique de transcription réverse puis d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) a permis l'amplification très rapide de l'ARN génomique viral à partir d'échantillons cliniques et des protocoles de RT-PCR sont maintenant disponibles. Ces techniques améliorent les techniques

virologiques classiques pour l'obtention d'informations sur le sérotype, le sérotype et le topotype du virus.

Épreuves sérologiques : les réponses sérologiques chez les ruminants apparaissent environ 7 à 14 jours après infection par le BTV et persistent en général longtemps. Historiquement, des épreuves telles que l'immunodiffusion en gélose et les techniques immuno-enzymatiques (ELISA) étaient utilisées pour détecter les anticorps du sérotype BT spécifique d'espèce mais ces épreuves ont l'inconvénient de ne pas différencier les anticorps induits par les BTV ou les virus de l'EHD. Un ELISA de compétition utilisant un anticorps monoclonal a résolu ce problème et l'utilisation d'ELISA de compétition est recommandée pour détecter les anticorps anti-BTV. Les protocoles classiques pour déterminer la spécificité de type des anticorps sont plus complexes et prennent plus de temps parce qu'ils nécessitent d'étudier la capacité des sérums à éprouver à neutraliser des virus de sérotypes connus dans des tests de séroneutralisation virale qui sont longs à mettre en œuvre.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : la vaccination est utilisée dans plusieurs pays dans le monde pour réduire les pertes directes, limiter la circulation du BTV et permettre les mouvements d'animaux. Pendant de nombreuses années, l'Afrique du sud a utilisé des vaccins à virus vivants atténués qui sont spécifiques de sérotype. Les vaccins à virus vivants atténués sont produits en adaptant les isolats de BTV par culture in vitro soit sur systèmes cellulaires soit sur œufs de poule embryonnés. La stimulation d'une forte réponse humorale est directement liée à leur capacité à se multiplier chez l'hôte vacciné. Les vaccins à virus vivants atténués sont bons marché, faciles à produire en grandes quantités, et ils induisent une solide immunité après une seule injection. Ils se sont révélés efficaces pour prévenir la maladie clinique. Les conséquences indésirables sont une baisse de la production de lait, des avortements ou une mort de l'embryon ou des effets tératogènes chez les nouveaux-nés issus de brebis vaccinées au cours du premier tiers de la gestation. Un autre risque lié à l'utilisation de vaccins à virus vivants atténués est la possibilité d'être disséminés par les vecteurs avec réversion éventuelle à la virulence et/ou réassortiment des gènes des virus vaccinaux avec ceux des virus sauvages. La fréquence et les implications de tels événements sont très peu connues mais la dissémination de souches vaccinales a déjà été signalée en Europe. Le fait que les souches atténuées puissent être tératogènes constitue une raison importante pour mener des études sur la transmission : l'efficacité des vaccins, leur pouvoir tératogène potentiel et les risques de transmission devraient faire l'objet de recherches. Les vaccins à virus inactivés ou recombinés devraient être préférés s'ils sont efficaces. Les vaccins à virus inactivés ne sont pas tératogènes et ont été utilisés pour gérer les foyers récents en Europe depuis 2004.

A. INTRODUCTION

Les moucheron de certaines espèces du genre *Culicoides* (l'hôte invertébré) (39) transmettent le virus de la fièvre catarrhale du mouton (FCO ou « bluetongue ») à des ruminants réceptifs après s'être infectés à partir d'animaux virémiques (l'hôte vertébré). Après une phase de réplication de 6 à 8 jours, le virus, qui a atteint les glandes salivaires de l'insecte, peut être transmis à un nouvel hôte vertébré pendant un repas sanguin. Les moucheron infectés le restent toute leur vie. Le rôle central de l'épidémiologie de la FCO explique que la répartition et la prévalence de la maladie soient déterminées par des facteurs écologiques tels que la pluviométrie élevée, la température, l'humidité, la nature des sols qui favorisent la survie des insectes (6). Dans de nombreuses régions du monde, l'infection a, par conséquent, une évolution saisonnière (43). Il est admis que le virus de la fièvre catarrhale du mouton (BTV pour *Bluetongue Virus*) ne provoque pas d'infections latentes chez les ruminants et que sa survie dans le milieu extérieur est liée à l'insecte (20, 23). La répartition du BTV peut être envisagée sur la base de systèmes épidémiologiques eux-mêmes basés sur les espèces vectrices présentes et leur biologie (40).

Les hôtes vertébrés de la FCO sont des ruminants domestiques ou sauvages, tels que les moutons, les chèvres, les bovins, les buffles, les cervidés, la plupart des espèces d'antilopes africaines et de nombreuses espèces d'Artiodactyles comme les chameaux. Bien que des anticorps et, dans certains cas de l'antigène, aient été retrouvés chez des carnivores, des félins, des rhinocéros blancs et noirs et des éléphants, le rôle des espèces non ruminantes chez les animaux sauvages reste inconnu. Les conséquences de l'infection varient de la forme asymptomatique chez la grande majorité des animaux infectés, en particulier les bovins, à des formes mortelles chez un pourcentage variable de moutons, de chèvres, cerfs et ruminants sauvages (43). Cependant, la maladie clinique a été observée chez des bovins infectés par le BTV8 en Europe. Certaines races de mouton sont plus sensibles que d'autres, ce qui fait que, dans certains pays, les infections au BTV peuvent passer inaperçues et

n'être détectées que par une surveillance active (9). Le virus de la maladie hémorragique des cervidés (EHDV) peut provoquer une maladie clinique chez les ruminants sauvages identique à celle provoquée par le BTV.

La gravité des signes cliniques chez les moutons est très influencée par les conditions d'élevage et la race (43). Dans les cas graves, il s'agit d'une réaction fébrile associée à des manifestations inflammatoires et congestives, de l'œdème de la face et des hémorragies et des érosions des muqueuses. La langue peut montrer des lésions importantes de congestion, devient œdémateuse et sort de la bouche, et devient parfois cyanosée. La congestion active peut s'étendre à d'autres parties du corps comme les bourrelets coronariens des sabots, l'aîne, la région axillaire et le périnée. Une dégénérescence musculaire sévère est souvent associée. L'inflammation cutanée associée à une atteinte des follicules provoque une chute de laine. Souvent, les animaux refusent de se déplacer et, dans les formes graves, on observe aussi du torticolis. Lorsque les moutons meurent d'une infection aiguë, les poumons présentent des lésions inflammatoires inter-alvéolaires, de l'œdème alvéolaire et l'arbre bronchique est rempli de mousse. La cavité thoracique et la cavité péricardique peuvent contenir plusieurs litres de liquide hémorragique. Dans la plupart des cas, des lésions hémorragiques sont visibles à la base de l'artère pulmonaire (43).

Au plan taxonomique, le BTV est classé comme un séro groupe au sein du genre *Orbivirus*, de la famille des *Reoviridae*. Vingt séro groupes sont décrits au sein de ce genre qui comprend aussi les virus de l'EHD et de la peste équine (31). Au sein d'un séro groupe, les virus sont définis à l'aide des tests de séroneutralisation virale et 24 sérotypes du BTV ont été identifiés à ce jour. Il y a de nombreuses réactions sérologiques croisées entre les virus des sérotypes BT et EHD (31).

Les particules du BTV sont constituées par 3 couches protéiques. La capside externe est composée de 2 protéines VP2 et VP5. VP2 est l'antigène majeur de la neutralisation et est le support du déterminisme de la spécificité de sérotype. L'élimination de la capside externe VP2/VP5 laisse une particule icosaédrique à 2 couches qui est composée de 2 protéines majeures, VP7 et VP3 et de 3 protéines mineures ainsi que de 10 segments d'ARN double-brin. VP7 possède les déterminants antigéniques majeurs de groupe ainsi que les épitopes utilisés dans les tests immuno-enzymatique (ELISA) de compétition (c-ELISA) pour détecter les anticorps anti-BTV (30). VP7 peut aussi permettre l'attachement du virus aux cellules d'insectes (46).

Le séquençage du génome des BTV permet d'analyser et de différencier les souches isolées indépendamment du sérotype (16, 27, 36, 45). Même au sein d'un même sérotype, il est possible de mettre en évidence l'origine géographique probable d'une souche (16, 35). Ces études ont permis de détecter les mouvements des souches de BTV au niveau mondial. La mise en évidence d'associations entre certains génotypes et certaines espèces de vecteurs a conduit à la définition du concept d'écosystèmes virus-vecteur (9, 23, 40). Une meilleure connaissance de ces aspects épidémiologiques devrait faciliter plus tard le commerce international des ruminants.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène (épreuves prescrites pour les échanges Internationaux)

a) Isolement du virus

Les mêmes techniques sont employées pour les ruminants domestiques ou sauvages. De nombreux systèmes pour isoler le virus sont utilisés mais, en général, les méthodes les plus sensibles sont celles qui reposent sur l'inoculation à des embryons de poulets. L'inoculation à des moutons peut s'avérer utile si le titre viral dans le prélèvement de sang est faible comme cela peut se produire quelques semaines après infection. Des tentatives pour isoler le virus par inoculation à des cellules en culture *in vitro* s'avèrent plus pratiques, mais la sensibilité est souvent plus faible que dans les systèmes *in vivo* (15). La culture cellulaire est une technique très sensible pour l'isolement du virus de la maladie hémorragique du cerf.

- **Isolement du virus en embryons de poulets**

- i) Le sang est prélevé à partir d'animaux fébriles à l'aide d'un anticoagulant comme l'EDTA (acide éthylamine diamine tétra-acétique), l'héparine, ou le citrate de sodium puis les cellules sanguines sont lavées 3 fois avec une solution physiologique tamponnée au phosphate stérile (PBS). Les cellules lavées sont suspendues dans du PBS ou du chlorure de sodium isotonique ou bien conservées à +4 °C ou utilisées immédiatement pour tenter l'isolement du virus.
- ii) Pour une conservation de longue durée quand la réfrigération n'est pas possible, les échantillons de sang sont prélevés dans la glycérine oxalate-phénol. Si les échantillons peuvent être congelés, ils doivent être prélevés dans un tampon peptone-lactose ou diméthyle sulfoxyde à 10 % (41) et conservés à température inférieure ou égale à -70 °C. Le virus n'est pas stable pendant de longues périodes à -20 °C.

- iii) En cas de mortalité, les échantillons biologiques de choix pour tenter l'isolement du virus sont la rate et les nœuds lymphatiques. Les organes et les tissus doivent être gardés et transportés à 4 °C jusqu'au laboratoire où ils seront homogénéisés dans du PBS ou en solution saline et ensuite traités comme les cellules sanguines comme décrit ci-dessous.
- iv) Les cellules sanguines lavées sont remises en suspension dans de l'eau distillée ou soniquées en PBS puis une petite quantité de 0,1 ml de la suspension cellulaire est inoculée par voie intravasculaire à 5 à 12 embryons de 9 à 12 jours d'âge. Cette technique est difficile à réaliser et nécessite une grande expérience. Des détails techniques sont décrits dans Clavijo *et al* (7).
- v) Les œufs sont incubés dans une chambre humide à 32-33 °C et mirés tous les jours. Les mortalités embryonnaires observées dans les 24 premières heures après inoculation sont considérées comme non spécifiques.
- vi) Les embryons qui meurent entre le 2^e et 7^e jour sont conservés à 4 °C et les embryons qui restent vivants au 7^e jour sont tués. Les embryons infectés peuvent présenter un aspect hémorragique. Les embryons morts et ceux qui ont survécu au 7^e jour sont broyés en deux groupes séparés. La totalité de l'embryon, (après retrait de la tête) ou des mélanges d'organes notamment le foie, le cœur, la rate et les reins sont broyés et les débris sont enlevés par centrifugation.
- vii) Le virus présent dans le surnageant peut être identifié directement par ELISA de capture d'antigène (17) ou par transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR), ou indirectement par des méthodes de détection des antigènes telles que l'immunofluorescence ou une technique immuno-enzymatique (immunoperoxydase) et ce après amplification en culture cellulaire comme décrit dans la section suivante.
- viii) Si aucun embryon n'est mort après inoculation du matériel biologique, un inoculum obtenu à partir du premier œuf peut être repassé sur embryons de poulets ou en culture cellulaire.

- **Isolement du virus en culture cellulaire**

Le virus peut être isolé sur des cultures de cellules sensibles telles que les cellules L de souris, cellules de hamster nouveau né (BHK-21), cellules de rein de singe vert africain (Vero) ou cellules du clone C6/36 d'*Aedes albopictus* (AA). Avec des échantillons pour diagnostic, le rendement de l'isolement effectué directement sur culture de cellules est souvent plus faible que celui obtenu par passage sur embryon de poulets. Les taux de réussite les plus élevés sont obtenus avec un isolement du virus d'abord sur embryons de poulet suivi d'un passage sur cellules AA pour multiplication. Des passages complémentaires sur des lignées cellulaires de mammifères telles que BHK-21 ou Vero sont habituellement réalisés. L'effet cytopathogène (ECP) n'est pas nécessairement observé en cellules AA, mais il est bien observé sur cellules de mammifères. Les tapis cellulaires sont surveillés pendant 5 jours à 37 °C à 5 % de CO₂ en chambre humide jusqu'à l'apparition d'un ECP. Si aucun ECP n'apparaît, un second passage est effectué en cellules en culture. L'identité du BTV dans les cultures de cellules qui présentent un ECP doit être confirmée par différentes méthodes immunologiques décrites ci-dessous telles que l'ELISA de capture d'antigène, l'immunofluorescence, la technique à l'immunoperoxydase, la séroneutralisation (SN) ou par RT-PCR.

- **Isolement sur mouton**

- i) Les moutons sont inoculés avec des cellules lavées, obtenues à partir de 10 ml à environ 500 ml de sang ou de 10 à 50 ml de suspension tissulaire. Les inoculums sont administrés sous un volume de 10 à 20 ml par voie sous-cutanée. Des volumes supérieurs peuvent être utilisés et doivent être administrés par voie intraveineuse.
- ii) Les moutons sont surveillés pendant 28 jours, tous les jours pour la température et une fois par semaine pour la réponse humorale avec des tests sérologiques tels que c-ELISA comme décrits ci-dessous. Les prélèvements de sang collectés aux jours 7 et 14 après inoculation contiennent en général le virus à isoler ; conservé à 4 °C ou à – 70 °C, le virus reste viable.

b) Méthodes immunologiques

- **Sérologies de groupe**

Les *Orbivirus* sont groupés en sérogroupes en fonction de leurs réactivités sérologiques avec des anti-sérums spécifiques qui détectent les protéines conservées au sein des sérogroupes comme VP7. Les réactions sérologiques croisées entre les membres des sérogroupes BT et EHD soulèvent la possibilité qu'une souche d'EHDV puisse être confondue avec une souche de BTV sur la base d'une faible réaction en immunofluorescence à l'aide d'un sérum polyclonal anti-BTV. Pour cette raison, un anticorps monoclonal spécifique du sérotype BT peut être utilisé. Certains laboratoires ont produit de tels réactifs spécifiques de sérogroupes (2, 21). Les méthodes les plus communément utilisées pour le typage de groupe sont les suivantes :

i) *Immunofluorescence*

Des tapis de cellules BHK ou Vero cultivées sur lames (lamelles porte-objet) sont infectés avec des souches adaptées aux cultures tissulaires ou passées en embryons de poulets. Après 24 à 48 h à 37 °C ou après l'apparition d'un ECP modéré, les cellules infectées sont fixées avec des fixateurs tels que le paraformaldéhyde, l'acétone ou le méthanol, séchées et les antigènes viraux détectés à l'aide d'anti-sérums anti-BTV ou d'anticorps monoclonaux spécifiques, et des techniques classiques d'immunofluorescence.

ii) *ELISA de capture d'antigène*

L'antigène viral présent dans les broyats d'embryon de poulets, en milieu de culture (17), dans des insectes infectés (28) ou dans le sang de mouton peut être détecté directement. Dans cette technique, les protéines du virus sont capturées par des anticorps adsorbés sur le fond d'une plaque ELISA et, une fois fixées, elles sont révélées à l'aide d'un anticorps secondaire. L'anticorps de capture peut être un sérum polyclonal ou un anticorps monoclonal spécifique de sérotype et les anticorps obtenus à partir de cores viraux obtenus en baculovirus ont été utilisés pour détecter le virus capturé (17).

iii) *Technique immunospot*

De petits volumes (2 µl) de surnageant de cultures de cellules infectées ou des cellules infectées lysées ou soniquées sont adsorbés sur une membrane de nitrocellulose et séchés. Les sites de fixation non spécifiques sont bloqués par incubation dans une solution contenant du lait écrémé. Après incubation avec un anticorps monoclonal spécifique du sérotype BTV, l'anticorps fixé est révélé en utilisant un anticorps anti-IgG de souris marquée par la peroxydase (14).

• **Typage du virus par neutralisation**

Les épreuves de séroneutralisation virale sont spécifiques de chacun des 24 sérotypes viraux et peuvent être utilisés pour typer un isolat viral ou peuvent permettre de déterminer la spécificité des anticorps d'un sérum. Dans le cas d'un virus non-typé, les caractéristiques des sérotypes de BTV présents dans la région peuvent éviter généralement de tenter une neutralisation à l'aide des 24 sérotypes anti-sérums surtout quand des sérotypes enzootiques ont été identifiés.

Il existe de nombreuses méthodes fondées sur les cultures de tissus pour détecter la présence d'anticorps neutralisants anti-BTV. Les cellules en lignée couramment utilisées sont les cellules BHK, Vero et L929. Quatre méthodes pour typer le virus BTV sont décrites brièvement ci-dessous. Les antisérums spécifiques des sérotypes de BTV produits sur cobayes ou lapins sont réputés induire moins de réactions sérologiques croisées entre sérotypes que les anti-sérums de bovins ou de moutons. Il est important que les anti-sérums témoins soient inclus dans la réaction.

i) *Réduction de plaques*

Le virus à typer est dilué de façon à contenir 100 unités formant plaque (PFU) et est incubé soit sans antisérum soit avec des dilutions de chacun des antisérums de référence des sérotypes de BTV. Les mélanges virus/antisérum sont inoculés aux tapis cellulaires. Après adsorption et élimination de l'inoculum, une couche d'agarose est coulée sur les cultures cellulaires. Le titre neutralisant des sérums est défini comme l'inverse de sa dilution qui entraîne une réduction prédéterminée (par ex. 90 %) du nombre de plaques. Le virus non-identifié est considéré comme étant du sérotype contre lequel l'anti-sérum qui l'a neutralisé a été produit.

ii) *Inhibition de plaques*

Les épreuves sont réalisées dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre contenant des tapis de cellules confluentes qui sont infectées avec environ 5×10^4 PFU du virus de référence ou du virus non typé. Après adsorption et retrait de l'inoculum, les tapis sont recouverts d'agarose. Les anti-sérums de référence sont placés sur filtres circulaires en papier qui sont placés à la surface de la gélose. Les boîtes sont incubées pendant 4 jours au moins. Une zone de neutralisation du virus, illustrée par la survie des cellules du tapis, sera visible au niveau du disque contenant l'anti-sérum correspondant.

iii) *Méthode de neutralisation*

Environ 100 DICT₅₀ (Dose infectant 50 % de la culture tissulaire) du virus de référence ou du virus non typé sont déposés dans des cupules de 50 µl de volume de plaque de microtitrage et sont mélangés à un volume identique d'anti-sérums de référence dilué dans du milieu de culture. Environ 10^4 cellules sont déposées dans chaque puits sous un volume de 100 µl et après une incubation de 4 à 5 jours, la plaque est examinée à l'aide d'un microscope inversé. Le degré d'ECP est noté dans chaque puits. Les puits qui ne contiennent que des cellules ou des cellules et l'anti-sérum ne doivent pas présenter d'ECP. À l'opposé, les puits qui contiennent les cellules et le virus présentent un ECP importants. Le virus non identifié est considéré comme étant du même sérotype que le virus de référence neutralisé de la même façon par un anti-sérum.

iv) *Épreuve d'inhibition de la fluorescence*

L'épreuve rapide et simple de séroneutralisation virale (5) nécessite des concentrations différentes du virus inconnu et des concentrations standards des anti-sérums de référence. Les isolats cultivés sur cellules en culture sont dilués en série et mélangés avec chaque anti-sérum de référence dans des puits d'une lame Lab-tek pendant 1 h avant d'ajouter des cellules. Après une incubation de 16 h, les cellules sont fixées et sondées selon une méthode d'immunofluorescence à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique du sérotype BT. Le sérotype du virus correspond à la spécificité de l'antisérum qui entraîne la plus grande réduction du nombre de cellules fluorescentes.

c) **Transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)**

L'amplification dirigée d'acides nucléiques viraux a révolutionné le diagnostic de la BT (8, 27, 44). Les techniques de RT-PCR ont permis l'identification rapide de l'acide nucléique du BTV dans le sang et dans d'autres tissus des animaux infectés. Toutefois, il convient d'être prudent lors de l'interprétation des diagnostics basés sur la RT-PCR. En effet, ces techniques vont détecter de l'acide nucléique spécifique du virus, mais cela ne signe pas obligatoirement la présence de virus infectieux (24). La RT-PCR peut aussi permettre de grouper les *Orbivirus* et d'effectuer le typage en quelques jours après réception des échantillons cliniques (tel que le sang de moutons infectés) (29). Les méthodes traditionnelles qui reposent sur l'isolement du virus et son identification sérologique peuvent nécessiter jusqu'à 4 semaines pour obtenir des données sur le sérotype et le sérotype.

Les amorces oligonucléotidiques utilisées dérivent pour la plupart des séquences du segment 7 (codant la VP7) (44), segment 6 (codant la NS1) (8), segment 3 (VP3) (36), segment 10 (NS3) (4) et segment 2 (VP2) (27). La taille des produits amplifiés est généralement petite de l'ordre de plusieurs centaines de nucléotides mais peut aussi être celle d'un segment génomique complet. Dans la technique décrite ci-dessous, un produit dérivé du segment 6 de 101 nucléotides de long, est amplifié. Les amorces dérivées de gènes plus hautement conservés, tels que ceux codants VP3, VP7 et NS1, peuvent être utilisés pour réaliser un typage de groupe (c'est à dire qu'elles réagiront avec les génomes de tous les membres du sérotype BT) alors que les amorces déterminées à partir des segments codants VP2 fournissent des informations sur le sérotype. Une RT-PCR multiplex qui dépend de la taille des produits amplifiés a été utilisée pour identifier en une seule réaction les 5 sérotypes nord-américains, à la fois séparément ou en mélange (18).

Les séquences nucléotidiques de gènes connus de BTV peuvent varier selon la localisation géographique où le virus a été isolé (16). Ceci a constitué une opportunité unique de compléter les études sur l'épidémiologie de la BT en fournissant des informations sur l'origine géographique probable des isolats, un phénomène appelé géotypage. Ainsi, la détermination des séquences nucléotidiques de régions de l'ARN fournit des informations permettant de savoir d'où est originaire le virus. Il semble aussi que le séquençage d'isolats BTV provenant d'autres régions du monde puisse permettre une identification précise de l'origine géographique. Cependant, la relation entre les séquences et l'origine géographique pourrait ne pas être aussi évidente. Toutes les informations sur le séquençage sont importantes et les données obtenues sur les séquences des segments du BTV devraient être rendues publiques en les adressant aux sites web officiels :

http://www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA_virus_proteins/ et
http://www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA_virus_proteins/btv_sequences.htm.
<http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>

Les sites web offrent des arbres phylogénétiques de nombreux isolats de BTV basés sur les séquences des segments de l'ARN. Ces données permettront de disposer d'informations pour des études épidémiologiques et l'identification de nouvelles souches et permettront de sélectionner de nouvelles amorces pour d'autres RT-PCR, ou d'autres épreuves spécifiques de type.

Il a été rapporté que les acides nucléiques du BTV peuvent être détectés par RT-PCR dans le sang des bovins et des moutons infectés pendant au moins 30 jours, voire jusqu'à 90 jours, après isolement du virus. La présence de fragments d'acide nucléique viral ne permet pas de conclure à la présence du virus infectieux.

La capacité des épreuves de RT-PCR à détecter de très faibles quantités d'acides nucléiques a comme conséquence que ces épreuves sont extrêmement sensibles à des contaminations par des acides nucléiques exogènes. Ces derniers consistent en des amorces utilisées dans le laboratoire ou en des séquences polynucléotidiques préalablement amplifiées. Il est donc indispensable de disposer d'une zone « propre » contenant tous les équipements nécessaires pour la préparation des réactifs et des échantillons et une zone séparée avec son propre équipement pour l'amplification. Des gants imperméables en latex doivent être portés et changés fréquemment à toutes les étapes du protocole opératoire, en particulier après avoir manipulé des échantillons d'ARN ou d'ADN amplifiés. Ceci permettra d'éviter la contamination des réactifs et des échantillons par des RNases ubiquitaires et d'autres contaminants ainsi que de la

contamination croisée par l'ADN. Le risque de faux positifs, causés par des contaminations de laboratoire, justifie l'importance du séquençage des produits de RT-PCR pour déterminer si, par exemple, la séquence du produit d'amplification obtenue est identique ou différente de celle du contrôle positif. Les résultats faussement négatifs causés par exemple, par la faible quantité des prélèvements ou l'utilisation des amorces inappropriées, peuvent être identifiés par la mise en évidence de l'incapacité à amplifier à la fois le génome de BTV et un gène de l'hôte, tel que celui de la globine, présent dans les extraits cellulaires. Ce point est détaillé dans le Chapitre 1.1.5., « Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses ».

Il y a de nombreuses épreuves de RT-PCR qui sont actuellement utilisées et qui sont basées sur des méthodes différentes (elles varient en fonction de la transcriptase reverse, des enzymes d'amplification, des amorces ou des paramètres utilisés). La technologie change cependant rapidement. La diversité génétique du BTV rend le choix et la validation de la méthode dépendante de la région dans laquelle elle sera utilisée. C'est également le cas pour la PCR en temps réel qui sera certainement utilisée dans le futur en routine pour le diagnostic moléculaire. Les protocoles listés ci-dessous sont pour ces raisons seulement des exemples. De plus en plus, il sera important de se faire accréditer par rapport à une norme internationale telle que l'ISO 17025 pour maintenir une activité dans le diagnostic et de participer à des programmes de comparaisons inter-laboratoires. De tels programmes sont en cours de développement dans de nombreux pays.

La technique de RT-PCR décrite ici implique 3 étapes séparées. Dans la première, l'ARN du BTV est extrait du sang à l'aide d'un agent chaotrope tel que le thiocyanate de guanidine (GuSCN) qui permet de dénaturer les protéines et libère les ARN viraux. De nombreux kits de diagnostic commerciaux sont disponibles et le protocole décrit ci-dessous est celui du kit de diagnostic ISOQuick (Orca Research, Bothell, Washington, USA). Les réactifs fournis sont nombreux et leur utilisation est indiquée dans le protocole ci-dessous. D'autres kits de diagnostic sont disponibles et l'un d'eux, Trizol (Life technologies, Grand Island, New York, USA) est particulièrement utilisé pour l'extraction d'acides nucléiques viraux à partir de la rate ou du caillot sanguin. Les manipulateurs doivent suivre les protocoles décrits pour chacun des kits de diagnostic et utiliser les réactifs recommandés ou fournis avec le kit de diagnostic correspondant. La seconde étape est la dénaturation des ARN double brin et la transcription inverse pour synthétiser de l'ADN complémentaire qui est amplifié par RT-PCR. Dans le protocole décrit ci-dessus, le système TM Preamplification (Life technologies) est utilisé pour transcrire l'ARN viral et les réactifs sont ceux de Perkin Elmer pour la RT-PCR. Des kits de diagnostic et des réactifs équivalents sont disponibles auprès d'autres fabricants. L'étape finale de la technique est l'analyse des produits de RT-PCR par électrophorèse. Les procédures utilisées pour déterminer la séquence du produit amplifié ne sont pas décrites ici.

- **Extraction des ARN viraux**

- i) Le sang total d'animaux à éprouver ou d'animaux non infectés est prélevé sur EDTA et centrifugé à 800-1 000 *g* pendant 10 min. Le plasma est aspiré et les hématies sont doucement resuspendues en PBS stérile. Les hématies sont sédimentées par centrifugation à 1 000 *g* pendant 10 min et le surnageant est éliminé ;
- ii) Ensuite, 400 µl des hématies à éprouver sont ajoutés dans chacun des 4 tubes à micro centrifuger d'un volume de 1,7 ml et 400 µl des hématies témoins sont ajoutés dans deux des microtubes. Un volume identique d'eau sans RNase est ajouté dans chaque microtube ; les tubes sont vortexés rapidement pour mélanger et lyser les cellules. Deux microtubes contenant des hématies sont congelés à -70 °C pour conservation et l'extraction est poursuivie en deux exemplaires ;
- iii) Les hématies témoin et lysées sont centrifugées à 12 000-16 000 *g* pendant 10 min et le surnageant est éliminé. Ensuite, 800 µl d'eau sans RNase sont ajoutés et les tubes sont vortexés et centrifugés à la même vitesse pendant 10 min. Le surnageant est enlevé et le culot de globules rouges est séché ;
- iv) Un petit volume de BTV (c'est à dire 5 µl contenant 10³ à 10⁷ PFU) est ajouté à l'un des 2 culots d'hématies témoins. Ceci constitue le témoin positif. L'autre culot d'hématies constitue le témoin négatif ;
- v) Ensuite, 75 µl de tampon (IsoQuick réactif A) sont ajoutés à chaque culot puis les culots sont vortexés vigoureusement puis 125 µl du GuSCN contenant une solution de lyse (isoQuick réactif 1) sont ajoutés. Le mélange est vortexé vigoureusement pendant 30 s ;
- vi) Avant utilisation, le tampon d'extraction fourni avec le kit de diagnostic (isoQuick réactif 2 plus dye 2A) est mélangé vigoureusement et 500 µl sont ajoutés aux échantillons lysés. Ensuite 400 µl du tampon d'extraction (isoQuick réactif 2) sont ajoutés et les tubes sont vortexés pendant 10 s ;
- vii) Les tubes sont incubés à 65 °C pendant 10 min, vortexés rapidement 5 min après et centrifugés à 12 000 *g* pendant 5 min ;

- viii) La phase aqueuse (500 µl) est transférée dans un nouveau micro tube et un volume identique de tampon d'extraction (isoQuick réactif 2) est ajouté. Les tubes sont vortexés pendant 10 s et centrifugés à 12 000 *g* pendant 5 min ;
- ix) La phase aqueuse (330 µl) est transférée dans un nouveau microtube et de l'acétate de sodium sous 10 % du volume initial (33 µl) et 365 µl d'isopropanol sont ajoutés. Après les avoir doucement secoués, les tubes sont placés à -20 °C pendant 20 min à 1 h ;
- x) L'ARN est culotté par centrifugation à 12 000 *g* pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et 1 ml d'éthanol à 70 % est ajouté puis doucement mélangé. Après centrifugation à 12 000 *g* pendant 5 min le surnageant est retiré puis 1 ml d'éthanol à 100 % est ajouté. Les tubes sont congelés à -7 °C jusqu'à ce qu'une RT-PCR soit réalisée.

• **RT-PCR**

- i) L'ARN dans l'éthanol est centrifugé à 12 000 *g* pendant 5 min. L'éthanol est retiré et les tubes sont renversés afin de les faire sécher. Le culot, parfois difficile à visualiser peut ne pas être complètement sec ce qui rend difficile la mise en suspension. Un culot sec peut aussi tomber du tube renversé ;
- ii) Ensuite, 12 µl d'eau sans RNase sont ajoutés à chaque microtube, mélangés et chauffés à 65 °C pendant 5 à 10 min. Les échantillons sont placés dans la glace ;
- iii) Dans une zone propre, les solutions mères contenant 200 µmol/µl d'amorces A, B, C et D sont préparées dans l'eau sans RNase et conservées à -70 °C ;

Les amorces pour la première étape de la RT-PCR (pour amplifier les nucléotides 11 à 284 de l'ARN 6) sont :

Amorce A : 5'- GTT-CTC-TAG-TTG-GCA-ACC-ACC-3'

Amorce B : 5'- AAG-CCA-GAC-TGT-TTC-CCG-AT-3'

Les amorces de la RT-PCR nichée (amplification des nucléotides 170 à 270 de l'ARN6) sont :

Amorce C : 5'- GCA-GCA-TTT-TGA-GAG-AGC-GA-3'

Amorce D : 5'-CCC-GAT-CAT-ACA-TTG-CTT-CCT-3'

- iv) Les solutions d'amorces sont diluées à une concentration de 15 à 20 pmol/µl. Les amorces pour la première RT-PCR sont préparées en mélangeant des volumes identiques des amorces A et B. Les amorces pour la double RT-PCR sont préparées en mélangeant des volumes identiques des amorces C et D. Des petites aliquotes des mélanges d'amorces sont congelés à -20 °C ;
- v) Les tubes de RT-PCR sont marqués et pour la première étape de synthèse, 4,0 µl d'amorces (A+B) sont ajoutés à chaque tube. Les tubes sont placés dans de la glace ;
- vi) Dans une sorbonne, l'hydroxyde de méthyl-mercure est dilué dans 50 mM (dilution au 1/20) et du bêta-mercaptoéthanol est dilué à 350 mM (dilution au 1/40) dans de l'eau sans RNase. L'hydroxyde de méthyl-mercure et le bêta-mercaptoéthanol sont réputés hautement toxiques. L'utilisation de ces deux produits chimiques doit se faire avec énormément de précaution et le respect des réglementations est indispensable lors de leur pipetage. Des méthodes alternatives employant la dénaturation par la chaleur ont été décrites (22, 29) ;
- vii) Ensuite, 4 µl des échantillons d'ARN à tester et des ARN témoins positifs et négatifs (étape ii) sont ajoutés à 4 µl du mélange d'amorces dans les tubes à RT-PCR (45) ;
- viii) À chaque tube de RT-PCR, 2,0 µl de la dilution au 1/20 de l'hydroxyde de méthylmercure sont ajoutés en mélangeant doucement et laissés à température ambiante avant d'ajouter 2,0 µl du bêta-mercaptoéthanol au 1/40. Pour des raisons de sécurité, certains laboratoires utilisent la formamide plutôt que l'hydroxyde de méthylmercure pour la dénaturation des ARN double brin. Cependant, pour une sensibilité optimale, l'hydroxyde de méthylmercure est le meilleur ;
- ix) Dans une zone « propre » est préparé un mélange d'ADN complémentaire contenant les réactifs suivants dans un volume correspondant au nombre d'échantillons à tester. La quantité nécessaire est calculée par échantillons et les réactifs sont contenus dans le Superscript TM preamplification system (Life Technologies).

Tampon × 10 superscript TM (200 mM de Tris/HCl, pH 8,4 et 500 mM de KCl)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
Mélange dNTP (10 mM de chaque nucléotide triphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1,25 µl
Dithiothréitol (DTT) (0,1 M)	2,0 µl
Transcription inverse (200 unités/µl)	0,75 µl

- x) Ensuite, 8 µl du mélange sont ajoutés à chaque tube de RT-PCR jusqu'à un volume final de 20 µl ;

- xi) Les tubes RT-PCR sont placés dans un thermocycleur, tel que l'appareil GeneAmp™ PCR System 9600, qui est programmé pour la transcription inverse :

Maintenir 44 °C	50 min
Maintenir 4 °C	durée illimitée

- xii) Les tubes sont enlevés du thermocycleur et 1 µl de RNase H et une couche de paraffine sont ajoutés à chaque tube. Le thermocycleur est programmé ainsi :

Maintenir 37 °C	20 min
Maintenir 98 °C	4 min
Maintenir 4 °C	durée illimitée.

- xiii) Dans une zone « propre », est préparé un premier mélange d'amplification contenant les réactifs suivants et dans un volume nécessaire pour un nombre d'échantillons à tester. Tous ces réactifs, sauf l'eau, sont disponibles chez Perkin-Elmer. Les quantités sont données par échantillon

Eau sans RNase	62,0 µl
Tampon × 10 de PCR Perkin- Elmer (100mM Tris HCl, pH 8,3 et 500 mM KCl)	7,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	7,0 µl
Mélange dNTP (2,5 mM de chaque dNTP : dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4,0 µl
Taq ADN polymérase (5 unités/µl)	0,5 µl

- xiv) Le mélange est retiré de la zone « propre » et placé dans la zone d'amplification : 80 µl du mélange sont déposés dans chaque tube. La couche de paraffine ne doit pas être percée. Chaque tube contient maintenant 101 µl ;

- xv) Les tubes sont placés dans un thermocycleur qui est programmé comme suit (programme correspondant à l'appareil GeneAmp PCR system 9600 - les programmes pour d'autres appareils doivent être déterminés) pour la première étape d'amplification :

1 cycle :	Maintenir 95 °C	3 min
	Maintenir 58 °C	20 s
	Maintenir 72 °C	30 s
40 cycles :	Maintenir 95 °C	20 s
	Maintenir 58 °C	20 s,
	Maintenir 72 °C	20 s
1 cycle :	Maintenir 95 °C	20 s
	Maintenir 58 °C	20 s
	Maintenir 72 °C	5 min,
	Maintenir 4 °C	durée illimitée.

- xvi) Les tubes de RT-PCR sont préparés pour la PCR nichée dans une zone « propre », 15 min avant la fin de la première amplification et placés sur la glace :

Eau sans RNase	17 µl par tube
Mélange d'amorces pour la PCR nichée (C+D)	4,0 µl par tube
Couche de paraffine.	

- xvii) Quand la première amplification est terminée, les tubes sont retirés du thermocycleur et placés dans un poste de sécurité microbiologique (pas dans la zone propre). Ensuite, 1,5 µl du produit de première amplification sont transférés dans les tubes correspondants pour la RT-PCR nichée contenant les amorces correspondantes, l'eau et la couche de paraffine ;

- xviii) Les tubes sont placés dans le thermocycleur qui est programmé comme suit pour permettre la formation de la couche de paraffine :

Maintenir à 98 °C	4 min,
Maintenir à 4 °C	durée illimitée.

- xix) Sous une hotte dédiée, le mélange de RT-PCR nichée contenant les réactifs est préparé dans un volume suffisant pour le nombre d'échantillons qui doit être testé. Les réactifs utilisés sont les mêmes que pour la première RT-PCR (étape xii). La quantité est indiquée par échantillon :

Eau sans RNase	17 µl
Tampon 10x de RT-PCR	5,0 µl
MgCl ₂	3,5 µl
Mélange de dNTP	4,5 µl
Taq ADN polymérase	0,5 µl

- xx) Le mélange de RT-PCR nichée est transféré de la hotte au thermocycleur et 30 µl sont déposés dans chaque tube. Chaque tube contient ainsi 52 µl.
- xxi) Les tubes sont placés dans le thermocycleur qui est programmé comme suit pour la PCR nichée. Après remplissage, les tubes sont placés à 4 °C ou à –20 °C jusqu'à électrophorèse :

1 cycle :	Maintenir 95 °C	3 min
	Maintenir 58 °C	20 s
	Maintenir 72 °C	30 s
40 cycles :	Maintenir 95 °C	20 s
	Maintenir 58 °C	20 s
	Maintenir 72 °C	20 s
1 cycle :	Maintenir 95 °C	20 s
	Maintenir 58 °C	20 s
	Maintenir 72 °C	20 s
	Maintenir 4 °C	durée illimitée.

• **Analyse par électrophorèse des produits d'amplification**

- i) D'abord, le tampon 1× (0,045 mM Tris /borate, pH 8,6 et 1,5 mM EDTA) est préparé à partir d'une solution mère 10x. Dans le cas du système « Bio-rad Wide Mini-Sub cell », 700 ml de tampon sont préparés (100 ml pour le gel et 600 ml pour le tampon de la cuve) ;
- ii) Une solution à 3 % d'agarose 3/1 Nusieve (FMC Bioproducts, Rockland, Maine, USA) ou d'agarose similaire est préparée dans du tampon TBE. La solution est bouillie jusqu'à dissolution totale de l'agarose puis mise à refroidir jusqu'à 40 °C. Le bromure d'éthidium est ajouté à une concentration de 0,5 µg/ml à l'agarose et au tampon électrophorèse. Le bromure d'éthidium est une substance toxique. Il est indispensable de porter des gants, des vêtements de protection et des lunettes protectrices pendant la manipulation de ce produit ;
- iii) Les extrémités du support de gel à électrophorèse sont bouchées par du scotch et la solution d'agarose est coulée. Le peigne est inséré dans l'agarose qui est laissé à solidifier pendant 30 à 60 min. Le peigne et les scotchs sont doucement retirés de la cuve à électrophorèse ;
- iv) Le tampon d'électrophorèse est versé dans la cuve à électrophorèse puis le support du gel est placé dans la cuve de telle sorte que le tampon recouvre le gel d'agarose ;
- v) Les échantillons témoins positifs et négatifs sont préparés dans des microtubes de 0,65 ml comme décrit ci-dessous :
- | | |
|--|--------|
| Tampon de charge (cat. G-2526, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) | 5,0 µl |
| L'ADN amplifié de chaque tube de RT-PCR et un tube supplémentaire préparé pour une échelle ADN | 15 µl |
| Tampon de charge (cat. G-2526, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) | 5,0 µl |
| Marqueur de 100 pb (cat. 15268, –0,19, Life technologies, grand Island, New York, USA) | 1,0 µl |
- vi) Les échantillons sont déposés dans les puits correspondants du gel et mis à migrer à 65-75 V pendant 1 h à 1 h 30 jusqu'à ce que le colorant ait migré sur la moitié du gel. Le gel est transféré sur un transilluminateur et est photographié pour archivage. Utiliser un masque de protection contre UV pour visualiser les segments amplifiés ;
- vii) Les échantillons positifs vis à vis du génome du BTV présentent des fragments de 101 pb. Pour que l'épreuve soit interprétable, le contrôle positif doit présenter un fragment avec une taille correcte et le contrôle négatif et le témoin sans « ARN » ne doivent présenter aucun fragment visible. Les échantillons sont considérés comme positifs s'ils présentent un segment d'ADN de la même taille que celui du contrôle positif. Les échantillons testés en double doivent donner des résultats identiques. S'il y a une divergence, les analyses doivent être refaites ;
- viii) Un sac incolore (Ameresco, Solon, Ohio, USA) est placé dans le tampon d'électrophorèse toute la nuit pour enlever le bromure d'éthidium. Le tampon peut être vidé et le sac incolore, après 10 à 15 utilisations, doit être placé dans un container identifié pour élimination du bromure d'éthidium puis ensuite incinération.

2. Épreuves sérologiques

Les anticorps anti-BTV induits chez les animaux infectés peuvent être détectés de différentes façons dont la sensibilité et la spécificité sont variables. Les anticorps spécifiques de groupe et de type sont induits simultanément et si l'animal n'a pas été exposé auparavant au BTV, les anticorps neutralisants produits sont spécifiques du virus qui l'a infecté. Des infections multiples par différents sérotypes provoquent la production d'anticorps capables de neutraliser des sérotypes vis-à-vis desquels l'animal n'a pas été exposé.

a) Fixation du complément

Un test de fixation du complément pour détecter les anticorps anti-BTV a été largement utilisé jusqu'en 1982 puis a été remplacé par l'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) bien que le test fixation du complément soit encore utilisé dans certains pays.

b) Immunodiffusion en gélose (IDG) (épreuve prescrite pour les échanges internationaux).

L'épreuve d'IDG pour détecter les anticorps anti-BTV est simple à réaliser et l'antigène utilisé dans cet essai est relativement facile à produire. Jusqu'en 1992, cette analyse a été l'épreuve de référence dans les mouvements internationaux de ruminants. Cependant, un des désavantages de l'IDG est son manque de spécificité en particulier car il peut détecter des anticorps contre d'autres *Orbivirus* notamment ceux du sérotype EHD. Ainsi, les sérums positifs en IDG doivent être confirmés en utilisant une épreuve spécifique du sérotype BT. Le manque de spécificité et le caractère subjectif de la lecture des résultats ont encouragé le développement de techniques c-ELISA pour la détection spécifique d'anticorps anti-BTV. L'épreuve c-ELISA recommandée est décrite dans la section B.2.c.

• Protocole

- i) Une couche fine de 2,8 mm d'agarose à 0,9 % dans du NaCl à 85 % est préparée et des puits circulaires, de 4,0 mm de diamètre et séparés entre eux par 2,4 mm sont creusés selon le schéma de 6 puits autour d'un puits central ;
- ii) L'antigène viral est obtenu à partir d'une suspension brute de cellules BHK ou Vero infectées par un sérotype viral 24 ou 48 h auparavant. L'antigène peut être concentré par précipitation ou par ultrafiltration ;
- iii) Un sérum positif de référence et 3 sérums à éprouver sont placés alternativement dans les 6 puits qui entourent le puits central contenant l'antigène et les boîtes sont incubées entre 20 et 25 °C dans un environnement humide pendant 24 h ;
- iv) Une série d'arcs de précipités entre l'antigène et les sérums témoins positifs et ceux obtenus à partir des sérums de terrain fortement positifs seront en continuité avec ceux induits par les sérums contrôlés positifs. Pour les sérums de terrain faiblement positifs, les arcs de précipité s'approchent de l'antigène mais ne forment pas une ligne continue avec l'arc du sérum témoin positif correspondant. Avec les échantillons négatifs, les arcs de précipité continuent vers les puits des sérums de terrain sans s'incurver vers l'antigène ;
- v) Tous les sérums faiblement positifs et les autres sérums qui induisent des résultats douteux doivent être re-évalués en utilisant des puits de 5,3 mm de diamètre et écartés de 2,4 mm ou sont éprouvés à nouveau par la technique c-ELISA décrite ci-dessous ;

c) ELISA de compétition (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

L'ELISA de compétition (c-ELISA) ou de blocage pour la BT a été développé pour mesurer la réponse « anticorps anti-BTV » sans révéler les anticorps contre d'autres *Orbivirus* (1, 4, 21, 32, 37). La spécificité de l'épreuve repose sur l'utilisation d'un des anticorps monoclonaux anti-BTV tel que l'AcM 3-17-A3 (2) ou AcM 20E9 (21) ou AcM 6C5FF4D7 (26). Les anticorps proviennent d'un grand nombre de laboratoires mais, bien que tous différents, ils semblent tous se fixer sur la région amino-terminale de la protéine majeure de « core », VP7. Dans le c-ELISA, les anticorps des sérums à éprouver sont en compétition avec l'anticorps monoclonal pour la fixation à l'antigène. Le protocole suivant a été normalisé après des études comparatives effectuées entre de nombreux laboratoires internationaux.

• Protocole

Il existe plusieurs protocoles ; le protocole ci-dessous est un exemple.

- i) Premièrement, des microplaques à 96 puits sont sensibilisées par incubation pendant une nuit à 4 °C ou à 37 °C pendant 1 h avec 50 à 100 µl d'antigène dérivé de cultures cellulaires soniquées (2) ou de la protéine majeure du core, VP7, exprimée dans le baculovirus (33) ou dans des cellules de levure (26) et dilué dans un tampon carbonate 0,05 M à pH 9,6 ;

- ii) Les plaques sont lavées 5 fois avec du tampon PBST (0,01 M PBS contenant 0,05 % ou 0,1 % de Tween 20, pH 7,2) ;
- iii) Ensuite, 50 µl de sérum à tester sont ajoutés en double à une dilution unique (ou bien 1/5 ou 1/10) (21) dans du PBST contenant 3 % d'albumine sérique bovine (ASB) ;
- iv) Immédiatement, 50 µl d'une dilution précédemment définie d'anticorps monoclonal dans du PBST contenant de la ASB à 3 % sont ajoutés dans chaque puits. Les puits des témoins « anticorps monoclonal » contiennent du tampon de dilution à la place du sérum à tester ;
- v) Les plaques sont incubées pendant 1 h à 37 °C ou 3 h à 25 °C sous agitation continue ;
- vi) Après lavage, les puits sont remplis avec 100 µl d'une dilution appropriée d'anticorps de lapin anti-IgG (H+L) de souris marqués à la peroxydase dans du PBST contenant du sérum de bovin à 2 % ;
- vii) Après une incubation de 1 h à 37 °C, la solution du conjugué est enlevée et les plaques sont lavées 5 fois à l'aide de PBS ou de PBST. Les puits sont remplis avec 100 µl du substrat contenant 1,0 mM d'ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-acide sulfonique]), 4 mM de H₂O₂ dans 50 mM de citrate de sodium, pH 4,0) et les plaques sont agitées pendant 30 min à 25 °C (d'autres substrats peuvent être utilisés et la réaction peut se poursuivre sous agitation pendant une durée adaptée pour permettre l'apparition de la couleur) ;
- viii) La réaction est arrêtée par addition d'un réactif de blocage tel que l'azide de sodium ;
- ix) Après avoir sélectionné les « blancs » sur les puits contenant le substrat et les réactifs de blocage, les valeurs d'absorbance sont mesurées à 414 nm avec le lecteur ELISA. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et sont obtenus à partir des moyennes des densités optiques (DO) de chaque échantillon par la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [(\text{moyenne des DO de l'échantillon à tester}) / (\text{moyenne des DO des puits témoins de l'AcM}) \times 100]$$

NB : certains laboratoires préfèrent utiliser un témoin sérum négatif qui a précédemment montré un pourcentage d'inhibition de zéro plutôt qu'un témoin « AcM ».
- x) Les valeurs de pourcentage d'inhibition supérieures à 50 % sont considérées comme positives. Les inhibitions observées entre 40 et 50 % sont considérées comme douteuses. Les résultats des sérums testés en double peuvent varier tant qu'ils ne restent pas du même côté du seuil de positivité ;
- xi) Les sérums fortement ou faiblement positifs ainsi qu'un sérum négatif doivent être inclus dans chaque plaque. Le sérum faiblement positif doit donner 60 à 80 % d'inhibition et le sérum négatif doit donner moins de 40 % d'inhibition.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Des vaccins à virus atténués ou inactivés sont couramment disponibles. Des vaccins recombinés construits selon diverses approches sont en cours de mise au point, mais aucun n'a été autorisé pour l'instant ; ils ne seront donc pas traités dans cette section. En Afrique du Sud, des vaccins à virus atténués sont utilisés depuis plus de 40 ans et sont réputés induire une immunité réelle et longue (11). Les virus à virus atténués sont produits en adaptant des souches sauvages isolées sur le terrain à la culture *in vitro* par passages en série sur cultures cellulaires ou sur œufs de poules embryonnés. L'induction d'une forte réponse humorale du fait de ces vaccins, est en rapport direct avec leur capacité à se multiplier chez l'animal vacciné. La production en grandes quantités des vaccins à virus vivants atténués est peu onéreuse ; ils induisent une immunité protectrice après une seule injection et se sont révélés efficaces dans la prévention de la maladie clinique dans les régions où ils sont utilisés (10). Cependant, les vaccins à virus vivants atténués présentent quelques inconvénients potentiels ou documentés, comme, par exemple, une atténuation insuffisante dont les conséquences peuvent varier selon les races de mouton. Les effets indésirables potentiels sont une diminution de la production de lait, des avortements, de la mortalité ou des effets tératogènes quand ils sont employés chez des femelles gestantes au cours de la première période de la gestation. Un autre risque associé aux vaccins à virus vivants atténués est leur diffusion possible par les vecteurs avec une réversion éventuelle vers la virulence et/ou un réassortiment des gènes modifiés avec les gènes des souches sauvages. La fréquence et les conséquences de tels événements sont peu documentés, mais localement la dissémination naturelle de souches vaccinales a été signalée aux USA et en Europe (25, 42). C'est pourquoi, les vaccins à virus inactivés sont préférés quand ils sont efficaces. L'inactivation des virus élimine les risques de transmission vectorielle, de réversion à la virulence, des malformations fœtales et de la possibilité de réassortiment viral.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Pour les vaccins à virus vivants atténués, le virus de semence primaire est préparé à partir d'une seule plage d'un virus BTV atténué, passé en série. Les virus vaccinaux ont été atténués par passage soit sur œufs embryonnés, soit sur cultures cellulaires soit enfin par une combinaison des deux. Chaque lot de semence primaire doit avoir été analysé pour ce qui concerne la transmissibilité et la réversion vers la virulence avant le développement du vaccin. Les échantillons de vaccin préparés à partir du virus de semence secondaire au niveau de passage maximum autorisé doivent être testés sur moutons pour estimer l'absence de virulence, l'innocuité et l'immunogénicité.

Pour les vaccins à virus inactivés, les problèmes liés à l'atténuation ne sont pas à prendre en compte et l'approche qui a été retenue consiste à employer des souches sauvages de terrain ayant subi le plus petit nombre de passages afin d'obtenir une bonne antigénicité.

Le virus de semence primaire ne doit pas être contaminé par des bactéries, des virus (en particulier, les pestivirus), des prions, des champignons et des mycoplasmes. Pour les pestivirus, une attention particulière sera apportée au sérum de fœtus bovin utilisé pour les cultures cellulaires puisqu'il peut être contaminé. Il convient de vérifier que les semences de virus sont bien du sérotype désiré.

Les virus de semence doivent être séquencés et les données entrées dans la base de données ad hoc (34).

Les lots de semence secondaire, qui sont utilisés comme inoculum dans la production de vaccin, ne devraient pas avoir subi plus de trois passages après la semence primaire.

b) Méthode de culture

Bien que les premiers vaccins à virus atténués aient été produits sur embryon de poulets, les cultures cellulaires ont été utilisées par la suite pour l'adaptation du virus et les passages en série. Ces cellules sont les cellules primaires embryonnaires bovines, les cellules de reins d'agneau ou de fœtus de mouton et les lignées BHK (cellules de reins de hamster nouveau-nés). Les cultures cellulaires utilisées pour l'atténuation doivent être indemnes de virus contaminants.

Le BTV cultivé en vue de la production de vaccin inactivé est produit en grande quantité sur des cellules en suspension ayant été reconnues sensibles au virus.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Les vaccins BT doivent être sûrs et efficaces et une brève description des essais appropriés pour étudier ces paramètres est donnée ci-dessous. De plus, les vaccins atténués ne doivent pas redevenir virulents pendant la réplication chez l'animal vacciné ou être transmis à partir de tels animaux à des insectes vecteurs. Ce dernier critère est très important parce que la transmission de virus atténués par des insectes à des animaux non-immuns induit le risque de réversion vers la virulence notamment par les étapes de réplication dans chaque espèce hôte. Bien que les tests pour étudier la réversion vers la virulence et la dissémination sont rares, voire non réalisés, une brève description de ce qui est nécessaire est donnée. Étant donné qu'il existe de grandes variations de sensibilité selon les races de mouton, il importe de démontrer que les moutons utilisés pour la validation du vaccin sont bien sensibles au BTV.

i) Innocuité

Tous les vaccins doivent être testés quant à l'innocuité. Les tests d'innocuité pour les vaccins atténués ne concernent pas le pouvoir tératogène. Les virus atténués sont tératogènes et ne doivent pas être administrés à des femelles gestantes pendant la première moitié de la gestation sous peine de causer des avortements et des anomalies fœtales (12, 20).

Il convient d'apporter la preuve que les vaccins à virus vivants atténués sont bien avirulents. Des moutons, séronégatifs dans un test sérologique approprié (capable de détecter les anticorps même chez les animaux vaccinés), sont inoculés avec le lot de semence primaire. Les températures corporelles sont notées 2 fois par jour. Les animaux sont contrôlés à intervalles réguliers sur une période de 28 jours pour vérifier l'absence de signes cliniques et de toutes réactions locales ou systémiques qui confirme l'absence de virulence et l'innocuité. Les échantillons de sang prélevés à intervalles réguliers peuvent être utilisés pour mesurer la virémie et les réponses en anticorps. Pour que le test soit considéré comme validé, il faut que la mise en évidence de la réplication de la souche vaccinale soit effectuée chez tous les moutons et que ceux-ci ne présentent aucun signe clinique autre qu'une légère altération de l'état de santé. En Afrique sud, un index de l'intensité des réactions cliniques est calculé pour chaque animal entre les jours 4 et 14 et il doit être inférieur à une valeur seuil de référence.

ii) *Efficacité*

Des moutons vaccinés et non vaccinés doivent être éprouvés avec une souche virulente du même sérotype. Il est recommandé de n'utiliser que des virus sauvages ayant été de préférence passés uniquement sur ruminants, sans aucun passage sur œufs embryonnés ou en cultures cellulaires. Des virus cultivés sur ces derniers (utilisés pour l'isolement) pourraient entraîner une maladie clinique plus bénigne que la maladie naturelle (12). Les animaux sont observés pour l'apparition de signes cliniques de FCO et les températures rectales sont prises 2 fois par jour. Des échantillons de sang sont prélevés à intervalles réguliers pour mesurer la virémie et la réponse en anticorps. Des animaux témoins non vaccinés doivent présenter des signes cliniques de FCO et une virémie. Cependant, il est difficile d'obtenir avec certitude l'apparition de signes cliniques après inoculation de mouton avec certains sérotypes et isolats du BTV, et par conséquent, le seul élément confirmant l'infection des animaux repose sur la mise en évidence d'une augmentation de la température de 1,7 °C au moins par rapport à la moyenne des températures avant épreuve et d'une virémie. Comme preuve supplémentaire de l'infection, les sérums pré et post vaccination sont analysés pour détecter la présence d'anticorps neutralisants.

iii) *Transmissibilité*

La transmissibilité est un problème à étudier pour les vaccins à virus vivants atténués mais pas pour les vaccins à virus inactivés. Les protocoles pour déterminer si le virus atténué peut être transmis par des insectes qui se nourrissent à partir de moutons vaccinés et virémiques sont difficiles à réaliser et à analyser statistiquement et en conséquence, le critère de validation est rarement recherché. Des données de laboratoire indiquent que les souches virales adaptées en laboratoire peuvent être transmises par des insectes vecteurs (13, 31, 39). Un protocole adapté pour déterminer la transmissibilité de souche atténuée nécessite l'utilisation de moutons vaccinés qui pendant la phase virémique sont exposés à des *Culicoides* non-infectés et compétents qui ensuite, seront mis en contact avec des moutons non infectés qui seront testés pour détecter le BTV et les anticorps anti-BTV. Compte tenu du fait que les titres des virus atténués dans le sang des moutons vaccinés sont faibles, un grand nombre de *Culicoides* est nécessaire dont une faible proportion seulement s'infectera et vivront suffisamment longtemps pour prendre un repos sanguin et transmettre potentiellement le virus à des moutons non infectés. Il est difficile de mettre œuvre une expérimentation qui tient compte du nombre élevé de moutons vaccinés et d'insectes qui seraient impliqués dans une situation réelle. Des données actuelles indiquent que pendant la phase de virémie et contrairement aux souches sauvages, les souches adaptées en laboratoire peuvent être retrouvées dans la semence de taureaux et de béliers (19, 38). Les conséquences de ces observations pour la transmissibilité du virus ne sont pas encore claires. Une étude récente portant sur la semence de béliers vaccinés avec le vaccin à virus vivants atténués, sérotype BTV2, a montré que même si le virus n'a pas été retrouvé dans la semence, le vaccin a entraîné une baisse de la qualité du sperme (3).

Un protocole adapté pour déterminer la transmissibilité atténuée du virus est d'exposer des moutons récemment vaccinés et ayant une virémie à des *Culicoides* non infectés et viables. Ces *Culicoides* sont ensuite mis en présence de moutons non infectés qui sont alors surveillés pour la présence de BTV et d'anticorps anti BTV. Le titre en virus étant faible dans le sang des moutons vaccinés, un grand nombre de *Culicoides* devrait être nécessaire pour qu'un petit nombre deviennent infectés et transmettent à leur tour le virus aux moutons témoins. Il est cependant difficile de mettre en place une expérience qui prendrait en compte les conditions réelles, c'est-à-dire le rapport entre les moutons vaccinés et les insectes. Bien que des titres de virus dans le sang d'un animal inférieurs à 10^3 DICT₅₀/ml soient considérés comme « sans danger », il semble bien qu'un titre plus faible ait parfois été suffisant pour permettre l'infection. Du fait, des interactions complexes qui existent entre le BTV, le vecteur et l'animal hôte, il importe de maintenir la virémie induite par les vaccins à virus vivants atténués au niveau le plus bas possible, notamment si la transmission vectorielle de la souche vaccinale constitue un problème.

iv) *Réversion vers la virulence*

Des études de validation confirment que les virus atténués ne redeviennent pas virulents chez les moutons vaccinés. En conséquence, si les insectes ne transmettent pas les virus atténués des animaux vaccinés aux animaux non vaccinés, la réversion vers la virulence pendant les différents cycles de réplication chez les moutons et les insectes devient une réelle possibilité. La seule façon de contrôler la réversion vers la virulence dans ces conditions est de comparer la virulence des virus vaccinaux avec celle de ceux qui ont subi des passages moutons-insectes comme décrit ci-dessus. Ceci est difficile à réaliser. Par conséquent, les effets du nombre de passages moutons-insectes sur la virulence des virus atténués, n'ont pas été déterminés. En Afrique du sud, il est admis que si le sang d'animaux vaccinés, prélevés pendant les phases virémiques est passé en série 3 fois sur moutons sans réversion vers la virulence alors les risques de réversion sur le terrain sont extrêmement faibles.

2) Méthode de fabrication

L'atténuation des isolats de terrain du virus de la BT a d'abord été réalisée par des passages en série sur embryon de poulets. En raison du problème soulevé par les animaux vaccinés avec du virus atténué sur œuf embryonné, il est recommandé de ne pas déplacer de tels animaux au niveau international (34). Plus récemment, il est apparu clairement que les passages en série sur des cellules en culture peuvent provoquer une atténuation de la virulence. Aucune étude n'a été réalisée pour déterminer le nombre exact de passages à effectuer et le degré d'atténuation obtenu pour des isolats individuels ou selon les sérotypes. Pour préparer des virus atténués, les isolats de terrain sont adaptés aux cellules en culture et sont passés 40 fois ou plus *in vitro*. Dans l'idéal, un certain nombre de virus sont clonés par la technique des plages à cette étape et chaque virus cloné est étudié pour déterminer le niveau de la virémie qu'il peut induire et sa capacité à entraîner une réponse immune chez les moutons vaccinés. Le virus qui convient le mieux est celui qui se réplique à bas titre mais induit une réponse protectrice et peut ainsi constituer le stock primaire de semence de la souche vaccinale.

Les vaccins à virus inactivés sont produits sur des systèmes à grande échelle de cultures cellulaires de manière aseptique et dans des conditions contrôlées. Les lignées cellulaires adaptées à la culture industrielle à grande échelle sont utilisées dès lors qu'elles ont été contrôlées indemnes de microorganismes contaminants. Quand la suspension virale atteint son titre maximum, les cellules sont éclatées et la suspension est clarifiée et filtrée. L'inactivation est ensuite réalisée selon la procédure adoptée par le fabricant (par exemple par utilisation d'éthylèneimine binaire ou d'autres inactivants). La procédure doit être en accord avec la législation en vigueur dans le pays d'intérêt, être validée pour assurer une inactivation complète et justifiée par une documentation appropriée. La procédure d'inactivation ne doit pas altérer de façon significative les propriétés immunogéniques des antigènes viraux. La purification est réalisée par chromatographie. Les virus inactivés sont alors concentrés par ultrafiltration et conservés. Pour fabriquer le vaccin, les antigènes BTV purifiés par chromatographie et concentrés sont dilués dans une solution tampon et des adjuvants sont ajoutés.

3) Contrôles en cours de fabrication

Tous les composés d'origine animale, y compris le sérum et les cellules, doivent être analysés pour rechercher la présence de bactéries, virus, champignons et mycoplasmes.

Les titres des virus atténués sont mesurés par l'infectiosité et en ELISA.

Pour les vaccins inactivés, des échantillons sont régulièrement prélevés à des heures précises au cours de la phase d'inactivation afin de suivre le taux et la linéarité du processus d'inactivation. Les titres du virus dans les échantillons sont mesurés par inoculation à des cellules BHK-21 ou toute autre culture cellulaire appropriée. À la fin du processus d'inactivation, le vaccin est vérifié et ne doit plus contenir de virus vivant.

4) Contrôle des lots

a) Stérilité

Chaque lot de vaccin doit être testé pour rechercher la présence de bactéries, de virus contaminants, champignons ou mycoplasmes. Par exemple, en Afrique du sud, un mélange de 10 ampoules choisies au hasard est inoculé à un bouillon de culture et à un bouillon de thioglycolate qui sont incubés à température ambiante et à 37 °C respectivement pendant 14 jours. S'il est contaminé, le lot est retiré.

b) Innocuité

L'innocuité de chaque lot de vaccin à virus vivant atténué est testée chez les souris adultes et nouveau-nés, les cobayes et les moutons. Si des effets délétères ou des manifestations cliniques sont notés, le test est répété. Toute augmentation de température chez l'animal cible qui est en dessus du seuil attendu pour une souche donnée d'un virus atténué est considéré comme un symptôme. Si, après un deuxième contrôle, les résultats sont non satisfaisants, le lot est retiré.

Les tests d'innocuité pour les vaccins inactivés sont réalisés sur mouton pour vérifier qu'il n'existe aucun effet secondaire indésirable.

c) Activité

Chaque lot est testé par inoculation à des moutons sensibles. Des sérums prélevés avant vaccination et 21 et 28 jours après vaccination sont testés par neutralisation virale pour déterminer le niveau d'anticorps neutralisants. Pour être validé, le titre en anticorps doit être égal ou supérieur à celui d'un sérum de référence défini dans le cadre des normes internationales portant sur les vaccins.

d) Durée de l'immunité

Les études effectuées sur les vaccins atténués montrent que les anticorps chez les moutons apparaissent moins de 10 jours après vaccination, atteignent leurs titres maximum 4 semaines plus tard et persistent pendant au moins 1 an. Il y a une relation entre l'augmentation des titres en anticorps neutralisants et la clairance du virus de la circulation périphérique. Les vaccins atténués contre le virus de la BT ont été utilisés depuis plus de 40 ans et sont réputés induire une immunité longue et efficace (43). La plupart des sérotypes peuvent être présents dans des régions d'enzootie en Afrique du sud où des vaccins polyvalents sont utilisés. L'introduction de 15 sérotypes dans le vaccin indique qu'une réponse immune efficace n'est pas générée contre tous les sérotypes, probablement parce que la masse antigénique des antigènes spécifiques de sérotypes est faible. Afin d'améliorer la réponse immunitaire, la vaccination est répétée tous les ans (11).

Les premières études concernant les vaccins inactivés montrent que des anticorps anti-BTV peuvent être détectés au 7^e jour après la vaccination avec une augmentation du titre entre les jours 14 et 21. Une seconde dose augmente encore le titre. Des études pour estimer la durée de l'immunité sont en cours.

e) Stabilité

Des protocoles ont été mis au point pour les vaccins à virus atténué. La stabilité doit être testée sur une période de 2 ans. Les vaccins sous forme liquide ou lyophilisée sont réputés avoir une demi-vie de 1 et 2 ans respectivement. Chaque lot de vaccin est soumis à un test accéléré d'étude de la demi-vie à 37 °C pendant 7 jours. Il est titré et évalué selon des normes et selon les analyses initiales du vaccin.

Jusqu'à présent, les vaccins inactivés n'ont été utilisés que dans des situations d'urgence où la question de la stabilité ne se posait pas. Les durées exigées et les protocoles pour une utilisation en routine n'ont pas été établis.

f) Précautions d'emploi et mise en garde

Les vaccins à virus atténués doivent être utilisés pendant les saisons fraîches alors que la densité et l'activité des *Culicoides* sont au plus bas. Ils ne doivent pas être utilisés ni chez les brebis gestantes au cours de la première moitié de la gestation, ni chez les béliers 2 mois avant la saison de monte.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

voir C.4.b.

b) Activité

voir C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AFSHAR A., THOMAS F.C., WRIGHT P.F., SHAPIRO J.L. & ANDERSON J. (1989). Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting bluetongue virus antibodies in cattle and sheep. *Vet. Rec.*, **124**, 136–141.
2. ANDERSON J. (1984). Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus. *J. Immunol. Methods*, **74**, 139–149.
3. BRÉARD E., POZZI N., SAILLEAU C., CATINOT V., DURAND B., DUMONT P., GUÉRIN B. AND ZIENTARA S. (2007). Transient effect of the attenuated bluetongue virus vaccine on the quality of the ram semen. *Vet. Rec.*, **160** (13), 431–435.
4. BILLINIS C., KOUMBATI M., SPYROU V., NOMIKOU K., MANGANA O., PANAGIOTIDIS C.A. & PAPADOPOULOS O. (2001). Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription-PCR: a comparison with conventional methods. *J. Virol. Methods*, **98**, 77–89.
5. BLACKSELL S.D. & LUNT R.A (1996). A simplified fluorescence inhibition test for the serotype determination of Australian bluetongue viruses. *Aust. Vet. J.*, **73**, 33–34.

6. CALISTRI P., GOFFREDO M., CAPOREALE V. & MEISWINKEL R. (2003). The distribution of *Culicoides imicola* in Italy. Application and evaluation of current Mediterranean models based on climate. *J. Vet. Med. B.*, **40**, 132–138.
7. CLAVIJO A., HECKERT R.A., DULAC G.C. & AFSHAR A. (2000). Isolation and identification of bluetongue virus. *J. Virol. Methods*, **87**, 13–23.
8. DANGLER C.A., DE MATTOS C.A., DE MATTOS C.C. & OSBURN B.I. (1990). Identifying bluetongue virus ribonucleic acid sequences by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **28**, 281–292.
9. DANIELS P.W., SENDOW I., PRITCHARD L.I., SUKARSIH & EATON B.T. (2004). Regional overview of bluetongue viruses in South-East Asia: viruses, vectors and surveillance. *Veterinaria Italiana*, **40**, 94–100.
10. DUNGU B., GERDES T. & SMIT T. (2004). The use of vaccination in the control of bluetongue in southern Africa. *Vet. Ital.*, **40**, 616–622.
11. ERASMUS B.J. (1975). The control of bluetongue in an enzootic situation. *Aust. Vet. J.*, **51**, 209–210.
12. FLANAGAN M. & JOHNSON S.J. (1995). The effects of vaccination of Merino ewes with an attenuated Australian bluetongue virus serotype 23 at different stages of gestation. *Aust. Vet. J.*, **72**, 455–457.
13. FERRARI G., DE LIBERATO C., SCAVIA G., LORENZETTI R., ZINI M., FARINA F., MAGLIANO A., CARDATI G., SHOLL F., GUIDONI M., SCICLUNA M.T., AMADDEO D., SCARAMOZZINO P. & AUTORINO G.L. (2005). Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype-2 among unvaccinated cattle in central Italy. *Prev. Vet. Med.*, **68**, 10–13.
14. GARD G.P. & KIRKLAND P.D. (1993). Bluetongue virology and serology. In: Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases, Corner L.A. & Bagust T.J., eds. CSIRO Information Services, P.O. Box 89, East Melbourne, Victoria 3002, Australia.
15. GARD G.P., WEIR R.P. & WALSH, S.J. (1988). Arboviruses recovered from sentinel cattle using several isolation methods. *Vet. Microbiol.*, **18**, 119–125.
16. GOULD A.R. (1987). The complete nucleotide sequence of bluetongue virus serotype 1 RNA3 and a comparison with other geographic serotypes from Australia, South Africa and the United States of America, and with other orbivirus isolates. *Virus Res.*, **7**, 169–183.
17. HAWKES R.A., KIRKLAND P.D., SANDERS D.A., ZHANG F., LI Z., DAVIS R.J. & ZHANG N. (2000). Laboratory and field studies of an antigen capture ELISA for bluetongue virus. *J. Virol. Methods*, **85**, 137–149.
18. JOHNSON D.J., WILSON W.C. & PAUL P.S. (2000). Validation of a reverse transcriptase multiplex PCR test for the serotype determination of U.S. isolates of bluetongue virus. *Vet. Microbiol.*, **76**, 105–115.
19. KIRKLAND P.D., MELVILLE L.F., HUNT N.T., WILLIAMS C.F. & DAVIS R.J. (2004) Excretio of bluetongue virus in cattle semen: a feature of laboratory adapted virus. *Vet. Ital.*, **40**, 497–501.
20. LUNT R.A., MELVILLE L., HUNT N., DAVIS S., ROOTES C.L., NEWBERRY K.M., PRITCHARD L.I., MIDDLETON D., BINGHAM J., DANIELS P.W. & EATON B.T. (2006). Cultured skin fibroblast cells derived from bluetongue virus-inoculated sheep and field-infected cattle are not a source of late and protracted recoverable virus. *J. Gen. Virol.*, **87**, 3661–3666.
21. LUNT R.A., WHITE J.R. & BLACKSELL S.D. (1988). Evaluation of a monoclonal antibody blocking ELISA for the detection of group-specific antibodies to bluetongue virus in experimental and field sera. *J. Gen. Virol.*, **69**, 2729–2740.
22. MAAN S., RAO S., MAAN N.S., ANTHONY S.J., ATTOUI H, SAMUEL A.R. & MERTENS P.P. (2007). Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses. *J. Virol. Methods*, **143**, 132–139.
23. MACLACHLAN N.J. (2004). Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Veterinaria Italiana*, **40**, 462–467.
24. MACLACHLAN N.J., NUNAMAKER R.A., KATZ J.B., SAWYER M.M., AKITA G.Y., OSBURN B.I. & TABERCHNICK W.J. (1994). Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay, and in vitro feeding of *Culicoides variipennis*. *Arch. Virol.*, **136**, 1–8.

25. MACLACHLAN N.J., OSBURN B.I., STOTT J.L. & GHALIB H.W. (1985). Orbivirus infection of the bovine fetus. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **178**, 79–84.
26. MARTYN C.J., GOULD A.R. & EATON B.T. (1990). High level expression of the major core protein VP7 and the non-structural protein NS3 of bluetongue virus in yeast: use of expressed VP7 as a diagnostic, group-reactive antigen in a blocking ELISA. *Virus Res.*, **18**, 165–178.
27. MCCOLL K.A. & GOULD A.R. (1991). Detection and characterisation of bluetongue virus using the polymerase chain reaction. *Virus Res.*, **21**, 19–34.
28. MECHAM J.O., DEAN V.C., WIGINGTON J.G. & NUNAMAKER R.A. (1990). Detection of bluetongue virus in *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) by an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Med. Entomol.*, **27**, 602–606.
29. MERTENS P.P., MAAN N.S., PRASAD G., SAMUEL A.R., SHAW A.E., POTGIETER A.C., ANTHONY S.J. & MAAN S. (2007). Design of primers and use of RT-PCR assays for typing European bluetongue virus isolates: differentiation of field and vaccine strains. *J. Gen. Virol.*, **88**, 2811–2823.
30. MERTENS P.P.C., MAAN S., SAMUEL A. & ATTOUI H. (2005). Orbiviruses. In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds., Elsevier Academic Press, Amsterdam, Netherlands, 466–483.
31. MONACO F., CAMMÀ C., SERINI S. & SAVINI G. (2006). Differentiation between field and vaccine strain of bluetongue virus serotype 16. *Vet. Microbiol.*, **116**, 45–52.
32. NARESH A. & PRASAD G. (1995). Relative superiority of c-ELISA for detection of bluetongue virus antibodies. *Indian J. Exp. Biol.*, **33**, 880–882.
33. OLDFIELD S., ADACHI A., URAKAWA T., HIRASAWA T. & ROY P. (1990). Purification and characterization of the major group-specific core antigen VP7 of bluetongue virus synthesized by a recombinant baculovirus. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2649–2656.
34. OSBURN B.I. (2004). Conclusions. In: *Proceedings of the Third OIE International Symposium on Bluetongue*. Taormina, 26–29 October 2003, MacLachlan N.J. & Pearson J.E., eds. *Vet. Ital.*, **40**, 713–726.
35. POTGIETER A.C., MONACO F., MANGANA O., NOMIKOU K., YADIN H. & SAVINI G. (2005). VP2-segment sequence analysis of some isolates of bluetongue virus recovered in the Mediterranean basin during the 1998–2003 outbreak. *J. Vet. Med. B.*, **52**, 372–379.
36. PRITCHARD L.I., GOULD A.R., WILSON W.C., THOMPSON L., MERTENS P.P. & WADE-EVANS A.M. (1995). Complete nucleotide sequence of RNA segment 3 of bluetongue virus serotype 2 (Ona-A). Phylogenetic analyses reveal the probable origin and relationship with other orbiviruses. *Virus Res.*, **35**, 247–261.
37. REDDINGTON J.J., REDDINGTON G.M. & MACLACHLAN N.J. (1991). A competitive ELISA for detection of antibodies to the group antigen of bluetongue virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **3**, 144–147.
38. ROBERTS D.H., LUCUS M.H. & BELL R.A. (1992). Animal and animal product importation and assessment of risk. In: *Bluetongue, African Horsesickness and Related Orbiviruses*, Walton T.E. & Osburn B.I., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 916–923.
39. STANDFAST H.A., DYCE A.L. & MULLER M.J. (1985). Vectors of BT in Australia. In: *Bluetongue and Related Orbiviruses*, Barber T.L. & Jochim M.M., eds. Alan R. Liss, New York, USA, 177–186.
40. TABACHNICK W.J. (2004). *Culicoides* and the global distribution of bluetongue virus infections. *Vet. Ital.*, **40**, 145–150.
41. THOMAS F.C. (1984). Comparison of some storage and isolation methods to recover bluetongue virus from bovine blood. *Can. J. Comp. Med.*, **48**, 108–110.
42. VENTER G.J., GERDES G.H., MELLOR P.S. & PAWESKA J.T. (2004). Transmission potential of South African *Culicoides* species for live-attenuated bluetongue virus. *Vet. Ital.*, **40**, 198–202.
43. VERWOERD D.W. & ERASMUS B.J. (2004). Bluetongue. In: *Infectious Diseases of Livestock*, Second Edition, Coetzer J.A.W. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, 1201–1220.

44. WADE-EVANS A.M., MERTENS P.P.C. & BOSTOCK C.J. (1990). Development of the polymerase chain reaction for the detection of bluetongue virus in tissue samples. *J. Virol. Methods*, **30**, 15–24.
45. WILSON W.C., MA, H.C., VENTER E.H., VAN DJIK A.A., SEAL B.S. & MECHAM J.O. (2000). Phylogenetic relationships of bluetongue viruses based on gene S7. *Virus Res.*, **67**, 141–151.
46. XU G., WILSON W., MECHAM J., MURPHY K., ZHOU E.M. & TABACHNICK W. (1997). VP7: an attachment protein of bluetongue virus for cellular receptors in *Culicoides variipennis*. *J. Gen. Virol.*, **78**, 1617–1623.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la Fièvre catarrhale du mouton (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

ÉCHINOCOCCOSE/HYDATIDOSE

RÉSUMÉ

Le diagnostic de l'échinococcose chez le chien et chez les autres carnivores sensibles repose sur la mise en évidence des cestodes d'adultes du genre Echinococcus ou de leurs œufs dans les fèces ou dans l'intestin grêle de ces animaux. Récemment, des épreuves avec les copro-antigènes et la copro-ADN se sont révélés utiles pour un diagnostic rapide, précis et fiable. Chez les animaux hôtes intermédiaires, le diagnostic dépend de la détection de vésicules hydatiques qui peuvent être rencontrées dans différents organes et tissus, et tout particulièrement le foie et les poumons.

Identification de l'agent pathogène : du point de vue taxonomique 5 espèces du genre Echinococcus sont actuellement reconnues. Ce sont E. granulosus, E. multilocularis, E. oligarthrus, E. vogeli et E. shiquicus. Echinococcus oligarthrus et E. vogeli sont moins fréquemment rencontrés que les deux premières espèces. Jusqu'à présent E. shiquicus n'a été trouvé que dans une région spécifique de la République populaire de Chine. Morphologiquement, les 5 espèces sont distinctes aussi bien au stade adulte qu'au stade larvaire. Pour E. granulosus, de nombreuses variantes intraspécifiques, montrant des caractéristiques morphologiques et biologiques, ont été décrites et elles peuvent être différenciées de façon fiable par l'analyse de l'ADN. Il a été envisagé d'élever au rang d'espèce certains génotypes de E. granulosus.

Habituellement, les formes larvaires d'Echinococcus peuvent être détectées à l'œil nu dans les organes parasités. Cependant, chez le mouton la recherche et l'identification des vésicules hydatiques d'E. granulosus doivent être faites avec le plus grand soin pour les différencier de Cysticercus tenuicollis, larve de Ténia hydatigena, car les deux types de larve sont souvent rencontrés chez le même animal. L'examen histologique d'organes ou de tissus fixés dans du formol permet la confirmation du diagnostic. La présence d'une couche adventicielle lamellaire, sans formation cellulaire, positive à la coloration de Schiff par l'acide périodique, avec ou sans la présence d'une membrane germinative interne à structure cellulaire, est considérée comme une caractéristique spécifique des métacestodes d'Echinococcus. L'identification des formes larvaires d'E. multilocularis chez les rongeurs et d'autres hôtes intermédiaires est possible par l'examen macroscopique ou microscopique et par détection de l'ADN en utilisant la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR).

La recherche d'Echinococcus spp. adulte chez l'hôte définitif nécessite un examen minutieux de l'intestin grêle des carnivores domestiques ou sauvages. La technique utilisant le traitement avec l'arécoline (test à l'arécoline) est généralement utilisée dans les enquêtes épidémiologiques pour déterminer la prévalence de l'infestation par E. granulosus chez les chiens. La manipulation du matériel (fèces, contenu et muqueuse de l'intestin) infecté présente un risque pour l'opérateur car il pourra contracter une maladie potentiellement mortelle. Un progrès significatif a été accompli suite à la mise au point d'épreuves immunologiques pour le diagnostic des infestations intestinales par Echinococcus grâce à la détection des antigènes parasitaires dans les fèces (copro-antigènes). Le test des copro-antigènes a été utilisé avec succès dans des enquêtes chez les chiens pour E. granulosus et il est actuellement employé pour les recherches de E. multilocularis chez les chiens, les renards et les chats. La détection des copro-antigènes est possible sur des échantillons de fèces collectés sur des animaux vivants ou morts et dans l'environnement.

Utilisés depuis plusieurs années déjà pour la détection de l'infestation par E. multilocularis et plus récemment par E. granulosus chez les hôtes définitifs, les méthodes faisant appel aux techniques de la biologie moléculaire (PCR/ADN) sont actuellement utilisées comme moyens de diagnostic de l'infestation dans les laboratoires spécialisés.

Épreuves sérologiques : des anticorps dirigés contre les oncosphères, le liquide hydatique et des antigènes provenant du protoscolex peuvent être détectés dans le sérum des chiens et des moutons infestés. Cependant, cette approche a encore actuellement une portée pratique limitée car elle ne permet pas la distinction entre les infestations précédentes et celles qui sont toujours en cours. D'autre part, des réactions croisées existent entre les infestations par *Echinococcus* et celles dues aux différentes espèces de *taenia*.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : un progrès a été accompli suite à la mise au point d'un vaccin efficace contre le stade larvaire d'*E. granulosus* chez le mouton et le bovin.

A. INTRODUCTION

Les espèces du genre *Echinococcus* sont de petits taenias des carnivores ayant des stades larvaires (métacestodes) ou kystes hydatiques qui ont un cycle de prolifération asexué chez divers mammifères y compris l'homme. Quatre espèces distinctes au plan morphologique étaient décrites pour le genre *Echinococcus* jusqu'à ce qu'une nouvelle espèce, *Echinococcus shiquicus*, soit ajoutée récemment aux espèces préalablement existantes : *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* et *E. vogeli*. *E. shiquicus* a été découverte dans le comté de Shiqu, sur le plateau Qinghai du Tibet, dans la région du Sichuan occidental, République Populaire de Chine (57, 58) ; elle est distincte des autres espèces au plan morphologique tant de l'adulte que des stades larvaires.

Des variantes inter et intraspécifiques ont été décrites pour *E. granulosus*. Quelques génotypes de cette espèce montrent des caractéristiques qui justifieraient, selon certains auteurs, leur identification en tant qu'espèces individualisées. D'autres espèces et génotypes d'*Echinococcus* ont été récemment proposés (51). Cependant, d'autres études sont encore nécessaires pour définir la gamme complète de la diversité génétique de ces parasites (32, 37, 43, 50). *E. granulosus* a une large répartition géographique, *E. multilocularis* est rencontrée dans de vastes régions de l'hémisphère Nord, *E. shiquicus* est retrouvée en République Populaire de Chine et, *E. oligarthrus* et *E. vogeli* sont confinées dans l'Amérique Centrale et l'Amérique du Sud. Les 5 espèces infestent l'homme chez lequel elles provoquent diverses formes d'hydatidose. L'hydatidose kystique, provoquée par les vésicules hydatiques d'*E. granulosus* et l'hydatidose alvéolaire, dues aux vésicules hydatiques d'*E. multilocularis* constituent un problème de santé publique considérable dans beaucoup de régions du monde (56).

Tableau 1. Caractéristiques utiles pour l'identification des espèces d'*Echinococcus*

	<i>E. granulosus</i>	<i>E. multilocularis</i>	<i>E. oligarthrus</i>	<i>E. vogeli</i>	<i>E. shiquicus</i>
Répartition	Cosmopolite	Région holoarctique	Région néotropicale	Région néotropicale	Plateau du Tibet
Hôte définitif	Chiens	Renards	Félins sauvages	Chien sauvage des buissons	Renard du Tibet
Hôte intermédiaire	Ongulés	Campagnols	Rongeurs néotropicaux	Rongeurs néotropicaux	Pika du plateau
Adulte					
Longueur du corps (mm)	2,0–11,0	1, 2–4,5	2, 2–2,9	3,9–5,5	1,3–1,7
Nombre de segments	2 à 7	2 à 6	3	3	2 à 3
Longueur des grands crochets (µm)	25,0–49,0	24,9–34,0	43,0–60,0	49,0–57,0	20,0–23,0
Longueur des petits crochets (µm)	17,0–31,0	20,4 –31,0	28,0–45,0	30,0–47,0	16,0–17,0
Nombre de testicules	25 à 80	16 à 35	15 à 46	50 à 67	12 à 20

Position du pore génital :

a. Segment mûr	Près du milieu	En avant du milieu	En avant du milieu	En arrière du milieu	Près du bord supérieur
b. Segment grvide	En arrière du milieu	En avant du milieu	Près du milieu	En arrière du milieu	En avant du milieu
Utérus grvide	Branchements latéraux	Sacciforme	Sacciforme	Tubulaires	Sacciforme
Métacestode	Uniloculaire dans les viscères	Multivésiculaire dans les viscères	Polykystiques dans les muscles	Polykystique dans les viscères	Uniloculaire dans les viscères

Source : Xiao et al. (58)

- ***Echinococcus granulosus***

C'est un parasite qui se transmet entre le chien et un certain nombre d'espèces d'ongulés domestiques ; le cycle chien/mouton étant le plus important. Des hôtes définitifs et intermédiaires sylvatiques peuvent également exister. C'est le cas, par exemple, du cycle renard/cervidés. Le ver adulte mesure 2 à 11 mm de long et possède, habituellement, 2 à 7 segments, avec une moyenne de 3 à 4. L'avant dernier segment est mûr et porte un pore génital ouvert, comme chez le segment grvide, dans sa moitié postérieure. Le segment grvide mesure habituellement plus que la moitié de la longueur totale du ver entier. La partie antérieure ou scolex est munie d'un rostre armé de 30 à 42 crochets de taille variable et disposés en 2 couronnes dont ceux de la première mesurent 25 à 49 µm et ceux de la deuxième 17 à 31 µm. Les caractères morphologiques des crochets et leur disposition sont utilisés dans l'identification morphologique de l'espèce. L'utérus grvide présente des formations sacciformes bien développées.

Le stade larvaire est un kyste opaque, tendu et élastique, rempli d'un liquide sous pression. Il est aussi connu sous le nom de vésicule hydatique d'*Echinococcus*. Ce kyste est dit uniloculaire, bien que ces compartiments puissent communiquer entre eux. Les vésicules hydatiques sont envahissantes et leur développement s'accompagne de la formation de vésicules-filles endogènes qui prennent naissance à partir des protoscolex de la membrane prolifère de la vésicule primitive. De diamètre variable et pouvant atteindre 30 cm, ces kystes sont fréquemment rencontrés dans le foie et les poumons, mais peuvent également se développer dans d'autres tissus et organes internes. Cette infestation larvaire est aussi connue sous le nom d'échinococcose kystique.

Les spécificités des souches d'*E. granulosus* pour les cycles domestiques classiques sont représentées par le type chien/mouton dans les régions Méditerranéennes, en Amérique du Sud (Argentine, Brésil, Chili, Pérou et Uruguay), en Afrique (Éthiopie, Kenya et Soudan), au Moyen Orient et les régions du Levant, la Russie, l'Asie Centrale (Kazakhstan, Kirghizistan et Ouzbékistan), la Mongolie, la République Populaire de Chine, l'Océanie et le Royaume-Uni ; le type chien/cheval en Belgique, en Irlande et au Royaume-Uni ; le type chien/bovin en Belgique, en Allemagne, en Afrique du Sud et en Suisse ; le type chien/porc en Pologne et le type chien ou loup/renne dans les régions sub-Arctiques de Norvège, de Finlande et de l'Alaska. Le statut de la souche chien/dromadaire nécessite encore des clarifications. Cette souche a récemment été identifiée comme responsable de cas humains en Argentine, au Népal, en République Populaire de Chine et en Iran (3, 19, 44, 59). À ce jour, à l'exception du génotype chien/cheval (G4) et des souches des cervidés finlandais (G10), tous les autres génotypes ont été reconnus infestant pour l'homme.

- ***Echinococcus multilocularis***

C'est un parasite qui se transmet essentiellement entre hôtes sauvages définitifs (ex. *Vulpes vulpes*, *V. ferrilata*, *V. corsac*, *Alopex lagopus*, *Canis latrans*) et les petits rongeurs arvicoles (campagnols et lemmings). Le ver adulte mesure 1,2 à 4,5 mm de long et possède habituellement 2 à 6 segments avec une moyenne de 4 à 5. L'avant dernier segment est mûr et le pore génital y est ouvert, comme pour le segment grvide, antérieurement à son milieu. L'utérus grvide présente des formations sacciformes. Le rostellum porte une première rangée de grands crochets mesurant 24,9 à 34,0 µm et une rangée intérieure de crochets plus petits mesurant 20,4 à 31,0 µm.

Le métacestode est un kyste polyvésiculaire se présentant comme un conglomérat de nombreuses petites vésicules de quelques millimètres de diamètre. Contrairement au kyste uniloculaire d'*E. granulosus*, celui d'*E. multilocularis* contient une matière gélatineuse, colloïde plutôt que liquide. La prolifération s'effectue par le bourgeonnement de vésicules-filles exogènes qui réalise une véritable infiltration des tissus avoisinants.

L'infestation par les larves d'*E. multilocularis* est communément appelée échinococcose alvéolaire. Enfin, aucune souche ou génotype distinct n'a encore été établi pour cette espèce, bien que des variations régionales au niveau continental aient été décrites (56).

Ce parasite zoonotique est retrouvé dans l'hémisphère nord où son cycle se réalise essentiellement dans la faune sauvage (25). Le cycle selvatique inclut le renard et de nombreuses espèces de rongeurs sauvages. Cependant, les coyotes, les chiens viverrins, les loups, les chats sauvages, les chiens et les chats domestiques (20, 27) peuvent servir d'hôtes définitifs tandis que les porcs, les chevaux, les primates et les humains peuvent être infectés en tant qu'hôtes intermédiaires (25).

- ***Echinococcus oligarthrus***

Les félidés sauvages néo-tropicaux (ex. *Felis concolor*, *F. jaguarundi*) sont les hôtes définitifs typiques d'*E. oligarthrus*, alors que les grands rongeurs (ex. *Dasyprocta* sp., *Cuniculus paca*) en sont les hôtes intermédiaires habituels. Le parasite adulte mesure 2,2 à 2,9 mm de long et comporte normalement 3 segments dont l'avant dernier est mûr et porte un pore génital en position antérieure à son milieu. Le segment gravidé présente un utérus montrant des formations sacciformes et un pore génital ouvert approximativement à son milieu. Cette espèce ne semble pas pouvoir atteindre le stade adulte chez le chien.

La vésicule hydatique d'*E. oligarthrus* est de type polyvésiculaire et remplie de liquide avec une tendance à la formation de nombreux compartiments qui paraissent cloisonnés. Le protoscolex porte un rostellum muni de crochets mesurant 25,9 à 37,9 µm. Ils sont décrits en détail et comparés avec ceux d'*E. vogeli* dans la section suivante. Le kyste mesure habituellement 5 cm de diamètre et est rencontré de préférence au niveau des organes internes et des muscles. À l'heure actuelle, peu de cas ont été rapportés chez l'homme. Il semble que le parasite ne devienne pas mature chez le chien.

- ***Echinococcus vogeli***

L'hôte définitif usuel d'*E. vogeli* est le chien sauvage des buissons (*Speothus venaticus*) d'Amérique du sud, mais le chien domestique est réceptif. Les hôtes intermédiaires sont représentés par de grands rongeurs tels que le paca (*Cuniculus paca*). Le parasite adulte mesure 3,9 à 5,5 mm de long et possède 3 segments dont l'avant dernier est mûr. Ce segment et le segment gravidé portent un pore génital situé au niveau de leur milieu. Le segment gravidé ne comporte pas de saccules latéraux et est caractérisé par sa forme relativement longue et tubulaire par rapport aux autres segments qui sont sacciformes.

La vésicule hydatique d'*E. vogeli* est similaire à celui d'*E. oligarthrus*. Il a été rapporté que les deux espèces peuvent être différenciées en comparant les tailles et les proportions des crochets que portent les protoscolex. Les grands et les petits crochets d'*E. oligarthrus* mesurent respectivement 25,9 à 37,9 µm (moyenne 33,4 µm) et 22,6 à 29,5 µm (moyenne 25,45 µm), alors que ceux d'*E. vogeli* mesurent 19,1 à 43,9 µm (moyenne 41,64 µm) et 30,4 et 36,5 µm (moyenne 33,6 µm) respectivement. D'autre part, par rapport à la longueur des crochets, la garde représente la moitié chez *E. oligarthrus* (50:50) et un peu moins du tiers (30:70) chez *E. vogeli*.

Echinococcus. vogeli est l'agent d'une zoonose dont une centaine de cas environ ont été rapportés chez l'homme en Amérique du sud. L'infestation due au stade larvaire est connue sous le nom d'échinococcose polykystique.

- ***Echinococcus shiquicus***

Le parasite a été trouvé chez un renard du Tibet (*Vulpes ferrilata*) qui est son hôte définitif et chez le pika des plateaux (*Ochotona curzoniae*) qui est son hôte intermédiaire. Dans la plupart des espèces d'*Echinococcus*, le segment gravidé est connecté au segment mûr ; mais cette espèce présente une particularité unique : un strobile consistant en seulement 2 segments (un segment gravidé directement attaché à un segment pré-mature) (56). Le stade adulte est semblable au plan morphologique à celui de *E. multilocularis*, à l'exception de crochets plus petits, de la présence de moins de segments, de la position supérieure du pore génital dans le segment pré-mature et de la présence de moins d'œufs dans le segment gravidé. On peut facilement le distinguer de *E. granulosus* car il est plus petit, son utérus ne comporte pas d'embranchement et par la position antérieure du pore génital dans le segment gravidé. L'adulte mesure de 1,3 à 1,7 mm.

Le métacestode est retrouvé dans le foie ; il s'agit d'un mini-kyste uniloculaire contenant des vésicules-filles pleinement développées ; cependant, des formes avec peu de vésicules ont aussi été décrites. Il se différencie d'*E. granulosus* qui n'a pas de vésicules filles dans le kyste fertile (56).

Le manuel de l'OMS/OIE sur l'échinococcose (56) présente une description détaillée de l'hydatidose humaine et animale.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Chez l'hôte intermédiaire, le diagnostic est basé sur la détection des vésicules hydatiques d'*Echinococcus* qui peuvent être rencontrées dans n'importe quel organe et tissu. Cependant, le foie et les poumons sont les organes les plus souvent affectés. Le diagnostic de l'échinococcose chez le chien et les autres carnivores est basé sur la découverte de cestodes adultes d'*Echinococcus* spp. dans leurs fèces ou dans leur intestin grêle suite à des autopsies, ou sur la mise en évidence d'antigènes spécifiques dans leurs fèces (copro-antigènes ou copro-ADN).

Le personnel qui recherche *Echinococcus* spp. dans les fèces ou dans l'intestin grêle est exposé au risque d'infestation par des agents responsables de maladies très graves pouvant être mortelles. Ce risque doit être réduit au minimum en suivant les procédures appropriées suivantes. Le matériel infestant peut être rendu inoffensif par une congélation de 48 h à une température atteignant -80°C au cœur du matériel congelé, ou de 4 jours à -70°C dans les mêmes conditions, ou enfin par chauffage à 70°C pendant 12 h (41, 45). L'opérateur doit porter en permanence des masques, des gants jetables et un tablier imperméable. Bien que l'hypochlorite de sodium puisse détruire une certaine proportion d'œufs (8), la désinfection chimique reste non fiable. Le matériel souillé doit être détruit par la chaleur ; l'eau chaude à une température supérieure ou égale à 80°C est très efficace. La décontamination des laboratoires peut être réalisée à un taux d'humidité plus réduit (40 %) combiné à une température ambiante plus élevée (30°C) pendant au moins 48 h.

a) Diagnostic des œufs d'*Echinococcus* dans l'environnement

- Échantillons de fèces (22, 49)

La séparation des fèces/œufs et la concentration des œufs d'*Echinococcus* est réalisée par une solution saturée : un prélèvement de fèces de 0,5 à 2 g est mélangé dans de l'eau ou une solution à 1 % de formol et 0,3 % de Tween 20 (42), dans un tube de 10 à 15 ml et centrifugé (1 000 g pendant 10 min.) une ou deux fois jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair. Le sédiment est mélangé soit avec du sulfate de zinc à 33 % (1,18 sp. Gr) soit avec une solution de sucrose (1,27 sp. Gr.) et centrifugé à 1 000 g pendant 5 à 10 min. Le tube est complètement rempli et recouvert d'une lamelle. La lamelle est examinée au microscope entre 2 et 16 h plus tard.

- Échantillons de sol (35)

Un échantillon de sol (20 g) est placé dans un tube conique de 50 ml dans lequel sont ajoutés 40 ml d'une solution à 0,05 % de Tween 80. Le mélange est agité vigoureusement et passé sur un filtre de 100 µm. La suspension est centrifugée à 1 000 g pendant 5 min et le surnageant est éliminé. La suite de la procédure est la même que celle suivie pour l'examen des échantillons de fèces.

b) Diagnostic de l'échinococcose larvaire

- Autopsie

Alors que la surveillance des vésicules hydatiques d'*E. granulosus* peut avoir lieu dans les abattoirs, celle des vésicules hydatiques d'*Echinococcus* spp. chez les animaux sauvages doit être réalisée par des enquêtes sur le terrain. Les spécimens isolés des tissus doivent être fixés dans du formol à 4 % ou réfrigérés à 4°C pour un examen rapide, et congelés à -20°C pour un examen ultérieur. Lors d'une enquête de surveillance des hôtes intermédiaire de *E. granulosus*, il est extrêmement important que les données soient stratifiées et rapportées en fonction de l'âge des animaux autopsiés. Les taux de prévalence sont très dépendants de l'âge (53) et les rapports des abattoirs où ne sont abattus que de jeunes animaux peuvent sous-estimer la situation réelle. Cela est dû au fait que les vieux animaux peuvent être très sévèrement infestés même quand ils n'abritent que très peu de larve.

Chez les animaux tels que le mouton et le bovin, les vésicules hydatiques d'*Echinococcus* peuvent être rencontrées dans divers organes et tissus. La palpation et/ou l'incision doivent être effectuées pour les mettre en évidence. Le porc, le bovin, le mouton et la chèvre peuvent être infestés par les larves de *Taenia hydatigena* qui sont, dans certains cas, difficiles à distinguer des vésicules hydatiques d'*Echinococcus* spp. lorsque ceux-ci parasitent le foie. Chez les animaux sauvages, tels que les ruminants et les rongeurs, le diagnostic différentiel est à faire avec plusieurs autres larves de cestodes.

Le matériel fixé par du formol peut être coloré en utilisant les techniques histologiques conventionnelles. La présence d'une couche stratifiée sans formation cellulaire, positive à la coloration de Schiff par l'acide périodique (PAS), sous-tendant un tissu connectif, avec ou sans la présence d'une membrane interne germinative, cellulaire et nucléée, peut être considérée comme une caractéristique spécifique des larves d'*Echinococcus* spp. La présence de protoscolex dans les vésicules-filles ou dans le « sable » du liquide échinococcique constitue également un critère de diagnostic pour le genre. L'identification génétique

d'*E. granulosus* ou *E. multilocularis* est habituellement faite en analysant l'ADN extrait de protoscolex ou de tissus larvaires (membrane germinative), réfrigérés, congelés ou conservés dans l'éthanol à 90 %.

c) Diagnostic de l'infestation des carnivores (hôtes définitifs)

• Autopsie

Alors qu'elle n'est utilisée dans les travaux portant sur l'infestation des carnivores domestiques que si leur euthanasie est humainement acceptée, l'autopsie est invariablement utilisée dans les études de l'échinococcose hydatique chez les carnivores sauvages. Le fait que l'examen des fèces dans les conditions normales ne puisse permettre la distinction entre les œufs d'*E. granulosus* de ceux des taeniidés, rend nécessaire l'isolement et l'identification des *Echinococcus* spp. adultes. Les œufs d'*E. granulosus* et d'*E. multilocularis* peuvent maintenant être distingués des œufs de taeniidés par la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR).

L'intestin grêle est prélevé aussitôt que possible après la mort puis ligaturé à ses 2 extrémités. Le matériel non congelé ou non fixé dans du formol (4 à 10 %) doit être examiné rapidement car les parasites subissent une lyse dans les 24 h. Le formol ne tue pas les œufs. L'organe est divisé en plusieurs parties qui sont en suite immergées dans du sérum physiologique (0,9 % de NaCl) porté à 37 °C puis ouvertes longitudinalement. Les parasites fixés sur la muqueuse doivent être recherchés et comptés sous la loupe (pour *E. granulosus* et *E. vogeli*). Pour dénombrer les *Echinococcus* spp., il est nécessaire de diviser l'intestin en 4 à 6 portions, les ouvrir longitudinalement puis les immerger dans du sérum physiologique (0,9 % de NaCl) pendant 30 min à 37 °C afin de détacher les parasites. Le contenu de chaque portion est lavé dans un récipient où l'on recueille aussi le produit de raclage de la muqueuse avec une spatule. Les produits de lavage et de raclage sont laissés sédimentés puis lavés à travers un tamis pour éliminer le maximum de débris et de particules et le rendre inoffensif. Le produit obtenu est placé dans un plateau à fond noir puis les parasites sont dénombrés sous une loupe. Chez le chien, *E. granulosus* est rencontré essentiellement dans le tiers antérieur de l'intestin grêle et *E. multilocularis* dans les parties moyennes ou postérieures.

L'autopsie est considérée comme la méthode de diagnostic la plus fiable pour le diagnostic d'*E. multilocularis* chez les hôtes définitifs. Il s'agit d'une technique économique pour déterminer la prévalence dans une population et du meilleur moyen pour calculer la charge parasitaire. En raison de la résistance des œufs d'*E. multilocularis* à une congélation de -50 °C, les carcasses ou les intestins des hôtes définitifs destinés à la recherche des parasites doivent subir une forte congélation atteignant -70 °C à -80 °C pendant 3 à 7 jours avant l'autopsie, afin de tuer tous les œufs.

Méthodes de détermination quantitative d'*E. multilocularis* dans l'intestin de l'hôte définitif.

• Sédimentation et technique de comptage (16, 21)

Cette technique peut être considérée comme la référence (*gold standard*) pour évaluer la sensibilité et la spécificité des autres techniques.

- i) L'intestin grêle est incisé longitudinalement et découpé en segments de 20 cm de long ou en 5 sections ayant approximativement la même longueur. Ces segments sont placés dans un flacon contenant 1 litre de sérum physiologique (0,9 % de NaCl).
- ii) Le flacon est agité vigoureusement pendant plusieurs secondes puis les sections d'intestin sont retirées. La couche superficielle de la muqueuse est retirée en exerçant une pression entre le pouce et l'index pour détacher les vers qui y sont attachés.
- iii) Le flacon est laissé sédimenter pendant 15 min. puis le surnageant est retiré. Le flacon est de nouveau rempli avec du sérum physiologique. La procédure est répétée 2 à 6 fois jusqu'à l'obtention d'un surnageant sans aucune particule colorée.
- iv) De petites fractions du sédiment (5 à 10 ml) placées dans des boîtes de plastique rectangulaires ou dans des boîtes de Petri sont examinées au stéréomicroscope (grossissement × 120), à l'aide d'une grille de comptage (9 × 9 cm).
- v) Si moins de 100 vers sont trouvés, la totalité du sédiment est vérifiée ; si un nombre supérieur est trouvé le fardeau parasitaire est calculé sur la base d'un sous-échantillon.

• Technique de raclage de la muqueuse intestinale (12, 17)

- i) Des raclages profonds de la muqueuse sont effectués à égale distance les uns des autres sur l'intestin grêle à l'aide d'une lame de microscope (75 × 25 × 1 mm). Il est recommandé de réaliser cet examen 5

fois pour chaque tiers (proximal, milieu, distal) de l'intestin grêle (15 au total sont recommandées). Le produit de raclage est récupéré dans une boîte de Petri.

- ii) Les produits de raclage sont écrasés entre deux lames et examinés au stéréomicroscope (x 120). Trois lames sont placées dans une boîte de plastique et examinées. *Echinococcus multilocularis* est rencontré essentiellement dans la deuxième moitié de l'intestin grêle.

- **Technique « d'agitation dans un flacon » (15)**

- i) On utilise un flacon de plastique (1 litre) dont le bouchon à vis présente un orifice central de 6 à 7 cm de diamètre. L'orifice est recouvert d'un filtre en acier de bonne qualité (taille des mailles du filtre : 500 µm) soudé sur le plastique à l'aide d'un anneau en fer. Une pâte au silicone est appliquée pour sceller les bords du filtre en acier.
- ii) L'intestin grêle ouvert tout du long et la totalité de son contenu sont déposés dans le flacon ; le flacon est rebouché et rempli avec de l'eau.
- iii) Le flacon est renversé et secoué ; l'eau est décantée. Le flacon est à nouveau rempli d'eau et le processus est renouvelé jusqu'à ce que l'eau décantée soit devenue claire.
- iv) Le flacon rempli à moitié d'eau est ouvert et l'intestin grêle est retiré. L'intestin est pressé entre le pouce et l'index pour déloger les parasites accrochés à la muqueuse et les faire tomber dans le flacon.
- v) Le flacon est refermé, rempli et secoué une dernière fois pour éliminer le plus d'eau possible.
- vi) Le sédiment qui reste dans le flacon est transvasé dans une fiole de 1 litre qui est conservée à 4 °C. Dans le cas d'un délai d'attente prolongé, il convient d'ajouter du sérum physiologique (0,9 % de NaCl) afin d'éviter une déformation des parasites.
- vii) Lors de l'analyse, le matériel est placé dans une boîte de Petri et examiné au stéréomicroscope comme précédemment.

- **Conservation des spécimens**

Les parasites adultes du genre *Echinococcus* sont fragiles et nécessitent, pour étudier leur morphologie d'être maintenus dans du sérum physiologique et de les manipuler avec une pipette Pasteur. Après un lavage avec du sérum physiologique, les parasites sont laissés dans celui-ci pendant 30 min environ pour que cessent leurs mouvements. Ils sont ensuite placés dans une solution froide (5 °C) de formol à 5 ou 10 % ou dans la solution de fixation FAA [éthanol à 95 % (80 ml), formol à 37 ou 40 % (10 ml) et acide acétique glacial (5 ml)] où ils sont laissés pendant 12 h. Pour les colorer, les vers doivent être préalablement lavés dans de l'eau pendant 15 min puis placés dans de la paracarmine de Mayer [acide carminique (1,0 g), chlorure d'aluminium (0,5 g), chlorure de calcium (4,0 g) et éthanol à 70 % (100 ml)] pendant 12 à 24 h. L'excès de colorant est éliminé par immersion pendant quelques secondes dans une solution d'acide chlorhydrique 0,5 à 1,0 %. La déshydratation est obtenue grâce à une série de passages de 15 min au moins dans chacune des solutions d'alcool à concentration croissante (41, 50, 70, 85, 95 et 100 %), avec deux passages pour la concentration à 100 %. L'alcool est éliminé grâce par un séjour de 10 min dans du xylol qui est éliminé avec du salicylate de méthyle ou du créosote. Avant de les monter dans un milieu convenable tels que le balsame, la picolyte, etc., les spécimens doivent être remis dans du xylol pendant quelques minutes. Les personnes qui réalisent ces manipulations doivent être soumises à des examens sérologiques annuels recherchant des anticorps anti-*Echinococcus* (56).

Des méthodes ont, récemment, été mises au point dans le but de simplifier et d'améliorer aussi bien les investigations épidémiologiques sur les hôtes définitifs que le diagnostic de l'infestation du vivant de ceux-ci. Elles sont basées sur la détection des antigènes parasitaires dans les fèces (copro-antigènes), ou de l'ADN des vers par la PCR (voir ci-dessous).

d) **Enquête et surveillance utilisant le test à l'arécoline**

Alors que l'arécoline a été abandonnée dans le traitement des infestations des populations canines par les cestodes au profit du praziquantel, ce ténifuge est encore utilisé dans les enquêtes sur les infestations par ces parasites. C'est un agent parasymphatomimétique qui provoque une sudation, une stimulation des glandes salivaires, gastriques et intestinales, et une augmentation du tonus de l'intestin et de la motricité de ses muscles lisses ; effets qui sont responsables de la purgation. Cette substance, qui est détoxifiée au niveau du foie, exerce également sur les vers une action directe non létale mais paralysante ; ce qui provoque leur détachement de la muqueuse intestinale. Il est donc nécessaire de l'administrer par voie orale. Ainsi, la purgation s'accompagne de l'expulsion des vers avec les fèces. Cette technique convient particulièrement pour les enquêtes de base. Cependant, 15 à 25 % des chiens ne répondent pas à cette purgation. L'arécoline peut aussi être utilisée pour purger les chiens infestés par *E. multilocularis*. L'intérêt

de la technique réside dans le fait que les vers expulsés peuvent être identifiés morphologiquement. Les produits renfermant de l'arécoline ne sont plus disponibles en tant qu'anthelminthique, mais peuvent être obtenus chez les sociétés qui fournissent des produits chimiques. En raison de ses effets secondaires, la purgation à l'arécoline est à proscrire chez les animaux débilisés, trop âgés et les chiennes gestantes. À la dose de 4 mg/kg, la purgation se produit dans les 30 min. La marche, le massage abdominal chez les chiens ne répondant pas, ou le lavement chez ceux présentant une constipation, permettent d'éviter une deuxième purgation, qui peut être réalisée éventuellement à la dose de 2 mg/kg, mais à laquelle on ne fait appel que de façon exceptionnelle.

Les chiens purgés avec succès évacuent d'abord des fèces qui peuvent être ignorées (ou collectées pour être examinées ultérieurement au laboratoire comme décrit ci-dessous), puis du mucus qui peut renfermer les vers. Ce mucus est divisé en plusieurs échantillons qui sont examinés séparément. La mise en évidence des vers restant difficile dans ce mucus, les échantillons (4 ml environ) sont dilués dans 100 ml d'eau puis recouverts d'une mince couche (1 ml) de paraffine et, enfin, bouillis pendant 5 min. La paraffine prévient la formation d'écume et réduit le dégagement d'odeur.

Les opérateurs qui exécutent ces techniques sont exposés au risque d'infestation et d'être atteints d'une maladie grave. Ils doivent porter des combinaisons couvrant le corps entier, des bottes, des gants à usage unique et des masques. Après usage, les combinaisons doivent être lavées à l'eau bouillante, les bottes désinfectées avec une solution d'hypochlorite de sodium à 10 %. Les déjections doivent être bouillies le plus tôt possible après le prélèvement. D'autre part, les chiens pouvant continuer à évacuer des œufs, des proglottides et des vers, il est nécessaire de les garder attachés durant les 2 h qui suivent la purgation en leur fournissant de l'eau à volonté. Enfin, après le test, une petite quantité d'essence est déversée sur le sol où ont séjourné les chiens examinés puis est enflammée.

e) Les tests recherchant les antigènes dans les matières fécales (copro-antigènes)

La détection des antigènes parasitaires dans les fèces en utilisant une méthode immuno-enzymatique (ELISA) ou « copro-antigènes ELISA » constitue une alternative au test d'arécoline. C'est un test prometteur car les copro-antigènes peuvent être détectés relativement tôt (10 à 14 jours) après l'infestation et leur taux diminue rapidement après l'expulsion des parasites. La sensibilité et la spécificité de ce test ont été estimées à 70 % et 98 % respectivement (2, 5, 8, 12, 13).

Il est vrai que le test d'arécoline fournit des résultats qualitatifs et quantitatifs et reste utile pour les études épidémiologiques de base en permettant les comparaisons entre les taux d'infection par les taeniidés chez les chiens. Il est, cependant, possible que des études montrent que, du point de vue coût, la détection des copro-antigènes soit plus intéressante que le test d'arécoline pour la surveillance de routine d'*E. granulosus* dans les populations canines (6).

Des tests ELISA recherchant les copro-antigènes spécifiques et ayant une spécificité et une sensibilité suffisantes pour remplacer le test d'arécoline pour détecter *Echinococcus* chez le chien et d'autres hôtes définitifs ont été mis au point (8). En recherchant les copro-antigènes spécifiques du genre *Echinococcus*, la spécificité du test est aux environs de 98 % et sa sensibilité globale est approximativement de 70 % ; mais si la charge parasitaire est supérieure à 50-100, la sensibilité approche les 100 % (2, 8, 9, 13). Des chiens domestiques, des chiens sauvages (dingos), des renards et des loups ont été testés avec succès en utilisant le test ELISA pour détecter les copro-antigènes. Ce qui est également important est que ce test détecte aussi des infestations du renard commun et du chien domestique par *E. multilocularis* (13, 46). Lorsque le test copro-antigènes ELISA utilise des anticorps anti-sécrétoires/excrétoires ou anti-somatiques de proglottides d'*E. granulosus*, la sensibilité envers l'infestation par *E. multilocularis* serait réduite, mais la sensibilité envers le genre demeurerait intacte. Cette technique, mise au point à l'origine pour détecter des copro-antigènes d'*E. multilocularis*, montre également une importante sensibilité et une spécificité atteignant 80 % vis-à-vis d'*E. granulosus* en utilisant des anticorps poly- ou monoclonaux (11, 44). Cependant, pour les charges parasitaires faibles (<50), sa sensibilité vis-à-vis d'*E. multilocularis* devient inférieure à celle de la méthode utilisant l'examen des produits de raclage de la muqueuse intestinale lors des autopsies (11).

La nature exacte des antigènes d'*Echinococcus* détectés dans les fèces n'a pas été complètement identifiée. Cependant, leur stabilité dans une solution de formol à 5 % après ébullition et leur sensibilité au traitement au périodate suggèrent la participation d'antigène(s) d'hydrate de carbone de grande taille (>150 KDa) avec des résidus de α -D-mannose, α -D-glucose, β -galactose et N-acétyl- β -glucosamine (8, 18).

Les copro-antigènes d'*Echinococcus* peuvent être détectés avant la production d'œufs ; ce qui indique qu'ils ne sont pas liés aux antigènes venant de ces derniers (13, 44). Ceci présente l'avantage de détecter l'infestation durant la période prépatente. D'autre part, les copro-antigènes retrouvent leur niveau d'avant l'infestation dans les 5 jours qui suivent le traitement anthelminthique (13). Et encore plus important, cette technique réduit le risque d'exposition du personnel à des œufs potentiellement dangereux comme c'est le cas avec la purgation ou l'autopsie (26).

Le test copro-antigènes ELISA représente une alternative spécifique et pratique pour palier les inconvénients des autopsies de renards (qui restent laborieuses) pour rechercher l'infestation par *E. multilocularis*. Les échantillons de fèces de renards doivent être prélevés au niveau du rectum (mieux qu'au niveau de l'intestin grêle). Les copro-antigènes restent stables dans les fèces de renards ou de chiens conservées à 20 °C (et dans les fèces congelées de chien) pendant une semaine. Ce test a également été utilisé avec succès pour évaluer l'efficacité du traitement de renards sauvages infestés par *E. multilocularis* avec du praziquantel sous forme d'appâts, ce qui s'est révélé une méthode efficace d'élimination de la source d'infestation (24).

- **Protocole pour la recherche des copro-antigènes d'*E. granulosus* (2, 9)**

- L'échantillon de fèces (collecté au niveau du rectum ou sur le sol) est mis dans un tube jetable de 5 ml et pourvu d'un bouchon. On y ajoute un volume égal de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,2 contenant 0,3 % de Tween 20 (PBST). Après avoir bien agité, le mélange est centrifugé à 2 000 *g* pendant 20 min à la température ambiante. Le surnageant peut-être utilisé immédiatement ou conservé à –20 °C au moins. Les surnageants qui apparaissent foncés ou visqueux sont aussi utilisables.
- Les puits d'une plaque de microtitrage ELISA de 96 puits (Immulon # 4, Thermo Electron Corporation) sont recouverts par la fraction IgG A purifiée d'un sérum immun de lapin dirigé contre un extrait de proglottides d'*E. granulosus* à une concentration optimale (habituellement 5 µg/ml) (2) dans 0,05 M du tampon carbonate/bicarbonate à pH 9,6 (100 µl/puits). La plaque est recouverte puis incubée à 4 °C pendant une nuit.
- Les puits sont rincés 3 fois avec du PBST à 1 min d'intervalle. Chaque puits reçoit ensuite 100 µl du même tampon puis la plaque est incubée à la température ambiante pendant 1 h.
- Le PBST est ensuite éliminé et chaque puits reçoit 50 µl de sérum fœtal de veau. Ensuite, 50 µl. du surnageant de l'échantillon de fèces sont ajoutés (2 puits par échantillon). La plaque est recouverte d'un film adhésif puis incubée pendant 1 h à la température ambiante.
- Les puits sont rincés comme dans l'étape iii, mais les contenus sont ajoutés à une solution à 10 % d'hypochlorite (agent blanchissant).
- Une dilution optimale (concentration d'environ 1 µg/ml) de l'IgG de lapin anti-extrait de proglottides d'*E. granulosus* conjugué à la peroxydase dans du PBST est d'abord déterminée (2) puis 100 µl de la dilution obtenue sont ajoutés à chaque puits. La plaque est ensuite incubée pendant 1 h à la température ambiante (entre 22 °C et 24 °C).
- Les puits sont ensuite rincés comme indiqué dans l'étape iii.
- Chaque puits reçoit 100 µl d'un substrat de tetraméthyl de benzène (Laboratoires TMB, KPL) et la plaque est laissée à l'obscurité pendant 20 min à la température ambiante (entre 22 °C et 24 °C).
- Pour arrêter la réaction, 100 µl d'acide phosphorique 1 M (H₃PO₄) sont ajoutés à chaque puits. La réaction est positive si la coloration vire du bleu au jaune. La lecture de la densité optique (DO), ou absorbance, au niveau des puits est réalisée à 630 nm.
- Les laboratoires doivent établir leurs critères déterminant le seuil de positivité en utilisant des témoins négatifs et positifs de référence. Ces derniers peuvent également être demandés aux Laboratoires de référence de l'OIE (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Habituellement, le seuil positif/négatif est déterminé en ajoutant 3 fois la déviation standard à la moyenne des DO des témoins négatifs de référence, ou contre un positif de référence en utilisant l'équivalence des unités d'absorbance.

- **Protocole pour la recherche des coproantigènes d'*Echinococcus multilocularis* (39, 42)**

Le test est un ELISA sandwich utilisant un anticorps monoclonal EmA9 dirigé contre l'antigène somatique de *E. multilocularis* (28).

- 0,5 g de l'échantillon de fèces sont placés dans un tube à centrifuger et une solution à 1 % de formol et à 0,3 % de Tween 20 est ajoutée pour un volume total de 15 ml.
- Après mélange, la suspension fécale est centrifugée à 1 200 *g* pour 10 min à température ambiante. Une fraction du surnageant est utilisée dans le test de recherche du copro-antigène.
- Des plaques pour micro-titrage à fond plat (Immulon 600, Greiner, Allemagne) sont sensibilisées avec 50 µl/puits d'IgG de lapin dirigée contre les produits d'excrétion/sécrétion d'*E. multilocularis* adulte

(1 µg/ml) dans un tampon 0,05 M de NaHCO₃/Na₂CO₃ (pH 9,6) ; les plaques sont laissées une nuit à 4 °C.

- iv) Les plaques sont lavées 3 fois avec 250 µl/puits de tampon phosphate (pH 7,4) contenant 0,05 % de Tween 20 (PBST), et bloquées avec 100 µl/puits de séralbumine bovine à 1 % pendant 1 h à température ambiante (22 – 24 °C).
- v) Les plaques sont lavées 3 fois (avec un désinfectant contenant 10 % d'eau de Javel) et 50 µl de surnageant fécal sont ajoutés à chaque puits et les plaques sont incubées pendant 2 h.
- vi) Les plaques sont de nouveau lavées 4 fois et 0,5 µg/ml d'AcM biotinylés (dans une solution de tampon phosphate à 0,5 % de séralbumine bovine/0,5 % de caséine) sont ajoutés à chaque puits et les plaques sont incubées pendant 1 h.
- vii) Les plaques sont lavées 4 fois et le complexe streptavidine-peroxydase de raifort biotinylé (Amersham Life Science), dilué à 1/1000 dans du tampon phosphate à 0,5 % de séralbumine bovine/0,5 % de caséine est ajouté à chaque puits et les plaques sont incubées pendant 1 h.
- viii) Les plaques sont lavées 5 fois et 100 µl de la solution de substrat (20 mg de phénylènediamine [Wako] dans 50 ml de tampon phosphate à 0,1 M d'acide citrique) et 10 µl de H₂O₂ sont ajoutés à chaque puits.
- ix) Les plaques sont agitées immédiatement et placées dans une étuve à 37 °C pendant 30 min. La réaction est arrêtée en ajoutant 50 µl de H₂SO₄ (4 N) dans chaque puits. Les densités optiques (DO) sont lues à 490 nm.
- x) La valeur seuil est calculée comme la moyenne des DO plus 3 écarts-types des échantillons provenant d'animaux non infestés.

Cette procédure a aussi été utilisée sous forme d'un ELISA sandwich pour la détection des copro-antigènes de *E. granulosus* (45). Depuis 2008, un test d'agglutination avec billes de latex et un kit d'immunochromatographie (produit en laboratoire) utilisant l'AcM EmA9 sont disponibles pour la détection des copro-antigènes (23, 41).

f) Méthodes de détection de l'ADN

Hôtes définitifs : L'ADN dans les fèces s'est révélé utile pour le diagnostic de l'échinococcose chez les hôtes animaux définitifs. Cependant, l'extraction de l'ADN à partir des fèces est une opération fastidieuse.

La PCR est une technique coûteuse et délicate à réaliser. Elle est couramment utilisée essentiellement pour confirmer d'autres tests sur des échantillons positifs pour la recherche des copro-antigènes ou pour l'identification d'œufs de taenidés récupérés de fèces. Le Tableau 2 présente les différentes amorces pour la PCR utilisées pour la détection de l'ADN fécal chez les hôtes définitifs du genre *Echinococcus*.

Le diagnostic différentiel de l'infestation des hôtes définitifs par *E. granulosus* ou *E. multilocularis* peut être réalisé grâce à la détection spécifique de l'ADN d'œufs d'*E. multilocularis* présent dans les fèces par une PCR (4, 32). Il est recommandé en pratique de trier les hôtes définitifs (par ex. les renards) à l'aide du test des copro-antigènes et de confirmer avec la PCR. En Europe, l'infestation par *E. multilocularis* se rencontre en général dans les régions où *E. granulosus* n'est pas enzootique ou n'est pas souvent rencontrée. Dans d'autres parties du monde, comme certaines régions du Proche-Orient (Turquie et Iran), l'Asie centrale, la Russie et la République Populaire de Chine, ces deux espèces peuvent être trouvées simultanément (10). Des recherches portant sur l'intermittence et la durée de l'élimination de l'ADN parasite sont encore nécessaires dans les cas d'infestation par *E. multilocularis*. Récemment, une technique PCR a été mise au point pour détecter l'ADN d'*E. granulosus* dans les fèces (Copro-ADN) et pour la différenciation génotypique (36, 55).

En règle générale, la PCR est utilisée comme un test de confirmation et il est recommandé de concentrer les œufs par tamisage. L'extraction de l'ADN à partir de ces œufs peut être réalisée en suivant un protocole simplifié de la technique de lyse alcaline combinée à l'usage d'un kit disponible dans le commerce qui ne nécessite pas d'extraction avec des solvants organiques (30).

Tableau 2. Amorces pour PCR utilisées pour la détection de l'ADN fécal (copro-ADN)
(tableau réalisé sur la base de Mathis et Deplazes [34])

Désignation des amorces : séquences des amorces (5'–3')	Réf.	Cible - Commentaires
<i>E. multilocularis</i> GTG-AGG-CGA-TGT-GTG-GTG-ATG-GAG-AGA-AGG CAA-GTG-GTC-AGG-GGC-AGT-AG	4	Gène ARNs U1 : peut donner des produits non spécifiques quand utilisé sur un prélèvement de métacyste contenant de l'ADN de l'hôte (observation non publiée) Gène mitochondrial ARN 12S ; utilisé dans une PCR nichée à 2 tubes
Amorces externes : (P60 sens) TTA-AGA-TAT-ATG-TGG-TAC-AGG-ATT-AGA-TAC-CC (P375 anti-sens) AAC-CGA-GGG-TGA-CGG-GCG-GTG-TGT-ACC Amorces internes : (Pnest sens) ACA-ATA-CCA-TAT-TAC-AAC-AAT-ATT-CCT-ATC (Pnest anti-sens) ATA-TTT-TGT-AAG-GTT-GTT-CTA	14	Gène mitochondrial ARN 12S ; modifié par rapport à la référence 14 pour être utilisé dans une PCR nichée à 1 tube.
Amorces externes : (Em-1) TAA-GAT-ATA-TGT-GGT-ACA-GGA-TTA-GAT-ACC-C (Em-2) GGT-GAC-GGG-CGG-TGT-TGT-A Amorces internes : (Em-3) ATA-TTA-CAA-CAA-TAT-TCC-TAT-C (Em-4) ATA-TTT-TGT-AAG-GTT-GTT-CTA (EM-H15) CCA-TAT-TAC-AAC-AAT-ATT-CCT-ATC (EM-H17) GTG-AGT-GAT-TCT-TGT-TAG-GGG-AAG	54	Gène mitochondrial ARN 12S ; modifié par rapport à la référence 14 pour être utilisé dans une PCR simple
<i>E. multilocularis</i> et <i>E. granulosus</i> ND1 (NDfor2-) AGT-TTC-GTA-AGG-GTC-CTA-ATA (NDrev2-) CCC-ACT-AAC-TAA-CTC-CCT-TTC	38	Séquences répétées de la « souche ovine » de <i>E. granulosus</i> ; elle donne un profil de bandes en électrophorèse Gène mitochondrial ARN 12S ; spécifique de la « souche ovine » de <i>E. granulosus</i> Elle amplifie un fragment du gène <i>cox1</i> spécifique de <i>E. granulosus</i>
<i>E. granulosus</i> (Eg1121a) GAA-TGC-AAG-CAG-CAG-ATG (Eg1122a) GAG-ATG-AGT-GAG-AAG-GAG-TG	1	
(Eg1f) CATTAATGTATTTTGTAAGTTG (Eg1r) CAC-ATC-ATC-TTA-CAA-TAA-CAC-C	47	

Tableau 2 (suite). Amorces pour PCR utilisées pour la détection de l'ADN fécal (copro-ADN) (tableau réalisé sur la base de Mathis et Deplazes [34])

Désignation des amorces : séquences des amorces (5'–3')	Réf.	Cible – Commentaires
(EgO/DNA-IM1) sens TCA-TAT-TTG-TTT-GAG-KAT-YAG-TKC Anti-sens GTA-AAT-AAM-ACT-ATA-AAA-GAA-AYM-AC	40	
<i>E. multilocularis</i> , <i>E. granulosus</i> et <i>Taenia</i> spp. (JB11) AGA-TTC-GTA-AGG-GGC-CTA-ATA (JB12) AC-CAC-TAA-CTA-ATT-CAC-TTT-C (60.for.-mod) ATG-TGG-TAC-AGG-ATT-AGA-TAC-CC (375.rev.-mod) GGT-GAC-GGG-CGG-TGT-GTA-CC	52	Cestodes
(Eg1f) CAT-TAA-TGT-ATT-TTG-TAA-AGT-TG (Eg1r) CAC-ATC-ATC-TTA-CAA-TAA-CAC-C	52	<i>Echinococcus granulosus</i> (souche ovine)
(EM-H15) CCA-TAT-TAC-AAC-AAT-ATT-CCT-ATC (EM-H17) GTG-AGT-GAT-TCT-TGT-TAG-GGG-AAG	52	<i>E. multilocularis</i>
(Cest1) TGC-TGA-TTT-GTT-AAA-GTT-AGT-GAT-C (Cest2) CAT-AAA-TCA-ATG-GAA-ACA-ACA-ACA-AG	52	<i>E. multilocularis</i>
(Cest4) GTT-TTT-GTG-TGT-TAC-ATT-AAT-AAG-GGT-G	52	<i>E. granulosus</i>
(Cest5) GCG-GTG-TGT-ACM-TGA-GCT-AAA-C	52	<i>Taenia</i> spp.
(Cest3) YGA-YTC-TTT-TTA-GGG-GAA-GGT-GTG (Cest5) GCG-GTG-TGT-ACM-TGA-GCT-AAA-C (Cest5seq) GAT-TCT-TTT-TAG-GGG-AAG-G	52	<i>Taenia</i> spp. (amorce pour l'amplicon de 267 pb de la PCR multiplex)

Hôtes intermédiaires : les méthodes d'hybridation de l'ADN ne sont pas actuellement utilisées pour la détection des vésicules hydatiques d'*E. granulosus* chez les animaux d'élevage hôtes intermédiaires du parasite. Les méthodes moléculaires sont, par contre, d'une grande utilité pour les études épidémiologiques car elles permettent d'identifier les isolats ou les souches d'*E. granulosus* (37).

Elles le sont aussi pour identifier des kystes d'*E. multilocularis* de petite taille, dégénérés ou calcifiés chez des hôtes intermédiaires normaux ou chez des hôtes anormaux (33).

2. Épreuves sérologiques

a) Hôtes intermédiaires

Les épreuves sérologiques, qui sont d'une grande utilité chez l'homme, sont moins sensibles et moins spécifiques chez les animaux d'élevage et ne peuvent remplacer l'autopsie pour le moment (8, 30).

b) Hôtes définitifs

Un important programme de recherche a été engagé en vue de mettre au point des tests de diagnostic immunologique pour lutter contre l'échinococcose canine. L'intestin d'un chien qui ingère un kyste hydatique est exposé à des antigènes variés durant l'établissement du parasite et le développement de l'ovogenèse. Des anticorps dirigés spécifiquement contre les oncosphères et les protoscolex peuvent être détectés dans le sérum des chiens infectés. La recherche de ces anticorps n'est actuellement pas utilisée dans la pratique car elle ne permet pas encore de différencier une infestation en cours d'une infestation déjà terminée mais dont les anticorps témoins sont encore présents ; elle donne aussi des résultats faux-positifs lors d'infestations par des espèces de *Taenia*.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

1. Hôtes intermédiaires

L'usage d'un vaccin efficace pour réduire l'infestation hydatique du bétail aurait probablement un impact non négligeable sur la fréquence de transmission de l'infestation à l'homme (29). Comme *E. granulosus* appartient à la famille des taenias, beaucoup d'aspects de ses relations immunologiques avec son hôte intermédiaire sont semblables à celles qui existent dans les autres espèces de *Taenia*. En outre, on considère que l'approche consistant en la mise au point d'un vaccin utilisé contre les espèces de *Taenia* tel que les antigènes natifs protecteur de l'hôte de *T. ovis*, pourrait donner des résultats avec *E. granulosus*. En utilisant la technologie de l'ADN recombiné, le vaccin EG95 basé sur un antigène de l'oncosphère s'est révélé capable d'induire une protection de haut niveau contre une infestation expérimentale de moutons par *E. granulosus* (31).

L'université de Melbourne et AgResearch de Nouvelle-Zélande a octroyé une licence à une société commerciale de la République Populaire de Chine pour la commercialisation du vaccin EG95 (29).

2. Hôtes définitifs

En dépit d'une activité de recherche considérable entreprise dans le but de protéger les chiens contre l'échinococcose en utilisant des antigènes totaux, seulement des résultats limités ont été obtenus jusqu'à aujourd'hui. Cependant, des études récentes avec des antigènes recombinés de protoscole semblent donner des résultats encourageants (7). Les progrès dans ce domaine nécessitent des recherches fondamentales portant sur l'immunologie de la muqueuse intestinale lors de l'infestation par *Echinococcus*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABBASI I., BRANZBURG A., CAMPOS-PONCE M., ABDEL HAFEZ S.K., RAOUL F., CRAIG P.S. & HAMBURGER J. (2003). Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **69**, 324–330.
2. ALLAN J.C., CRAIG P.S., GARCIA NOVAL J., MENCOS F., LIU D., WANG Y., WEN H., ZHOU P., STRINGER R., ROGAN M.T. & ZEYHLE E. (1992). Coproantigen detection for the immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans. *Parasitology*, **104**, 347–355.
3. BART J.M., ABDUKADER M., ZHANG Y.L., LIN R.Y., WANG Y.H., NAKAO M., ITO A., CRAIG P.S., PIARROUX R., VUITTON D.A. & WEN H. (2006). Genotyping of human cystic echinococcosis in Xinjiang, PR China. *Parasitology*, **133**, 571–579.
4. BRETAGNE S., GUILLOUN J.P., MORAND M. & HOUIN R. (1993). Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA hybridization. *Parasitology*, **106**, 193–199.

5. BUIISHI I., NJOROG E. M., BOUAMRA O. & CRAIG P. (2005). Canine echinococcosis in northwest Libya: assessment of coproantigen ELISA, and a survey of infection with analysis of risk factors. *Vet. Parasitol.*, **130**, 223–232.
6. BUIISHI I., WALTERS T., GUILDEA Z., CRAIG P. & PALMER S. (2005). Re-emergence of canine *Echinococcus granulosus* infection, Wales. *Emerg. Infect. Dis.*, **11** (4), 568–571.
7. CHABALGOITY J.A., MORENO M., CAROL H., DOUGAN G. & HORMAECHI E. (2001). *Salmonella typhimurium* as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. *Vaccine*, **19**, 460–469.
8. CRAIG P.S. (1997). Immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* and a comparison of techniques for diagnosis of canine echinococcosis. In: Compendium on Cystic Echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with Special Reference to Morocco, Andersen F.L., Ouhelli H. & Kachani M., eds. Brigham Young University Print Services, Provo, Utah, USA.
9. CRAIG P.S., GASSER R.B., PARADA L., CABRERA P., PARIETTI S., BORGUES C., ACUTTIS A., AGULLA J., SNOWDEN R. & PAOLILLO E. (1995). Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen and serum antibody tests with arecoline purgation in Uruguay. *Vet. Parasitol.*, **56**, 293–301.
10. CRAIG P.S., ROGAN M.T. & ALLAN J.C. (1996). Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. *Adv. Parasitol.*, **38**, 169–250.
11. DEPLAZES P., ALTHERR P., TANNER I., THOMPSON R.C.A & ECKERT J. (1999). *Echinococcus multilocularis* coproantigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay in fox, dog and cat populations. *J. Parasitol.*, **85**, 115–121.
12. DEPLAZES P. & ECKERT J. (1996). Diagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection in final hosts. *Appl. Parasitol.*, **37**, 245–252.
13. DEPLAZES P., GOTTSTEIN B., ECKERT J., JENKINS D.J., WALD D. & JIMENEZ-PALACIOS S. (1992). Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. *Parasitol. Res.*, **78**, 303–308.
14. DINKEL A., VON NICKISCH-ROSENECK M., BILGER B., MERLI M., LUCIUS R. & ROMIG T. (1998). Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 1871–1876.
15. DUSCHER G., PROSL H. & JOACHIM A. (2005). Scraping or shaking – a comparison of methods for the quantitative determination of *Echinococcus multilocularis* in fox intestines. *Parasitol. Res.*, **95**, 40–42.
16. ECKERT J. (2003). Predictive values and quality control of techniques for the diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in definitive hosts. *Acta Trop.*, **85**, 157–163.
17. ECKERT J., GEMMEL M.A., MESLIN F.X. & PAWLOWSKI Z.S. (EDS) (2001). WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. World Organization for Animal Health (OIE), Paris, France, pp 265.
18. ELAYOUBI F.A. & CRAIG P.S. (2004). *Echinococcus granulosus* coproantigens: chromatographic fractionation and characterization. *Parasitology*, **128**, 455–465.
19. FASIHI HARANDI M., HOBBS R.P., ADAMS P.J., MOBEDI I., MORGAN-RYAN U.M. & THOMPSON R.C.A. (2002). Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Parasitology*, **125**, 367–373.
20. HILDRETH M.B., SRIRAM S., GOTTSTEIN B., WILSON M. & SCHANTZ P.M. (2000). Failure to identify alveolar echinococcosis in trappers from South Dakota in spite of high prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild canids. *J. Parasitol.*, **86**, 75–77.
21. HOFER S., GLOOR S., MULLER U., MATHIS A., HEGGLIN D. & DEPLAZES P. (2000). High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. *Parasitology*, **120** (Pt 2), 135–142.
22. ITO S. (1980). Modified Wisconsin sugar centrifugal-floatation technique for nematode eggs in bovine faeces. *J. Jpn Vet. Med. Assoc.*, **33**, 424–429.
23. KAMIYA M. (2007). Collaborative control initiatives targeting zoonotic agents of alveolar echinococcosis in the Northern Hemisphere. *J. Vet. Sci.*, **8** (4), 313–321.

24. KAMIYA M., LAGAPA J.T., NONAKA N., GANZORIG S., OKU Y. & KAMIYA H. (2006). Current strategies against *Echinococcus* zoonosis in Japan. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **25**, 1055–1066.
25. KAMIYA M., LAGAPA J.T. & OKU Y. (2007) Research on targeting sources of alveolar echinococcosis in Japan. *Comparat. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **30** (5–6), 427–48.
26. KAMIYA M., NONAKA N., GANZORIG S. & OKU Y. (2004). Effective countermeasures against alveolar echinococcosis in red fox population of Hokkaido, Japan. *In: Echinococcosis in Central Asia: Problems and Solutions*, Torgerson P. & Shaikenov B., eds. INTAS Network Project, Zurich, Switzerland and Almaty, Kazakhstan, 273–282.
27. KAPEL C.M., TORGERSON P.R., THOMPSON R.C. & DEPLAZES P. (2006). Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *Int. J. Parasitol.*, **36** (1), 79–86.
28. KOHNO H., SAKAI H., OKAMOTO M., ITO M., OKU Y. & KAMIYA M. (1995). Development and characterization of murine monoclonal antibodies to *Echinococcus multilocularis* adult worms and its use for the coproantigen detection. *Jpn J. Parasitol.*, **44**, 404–412.
29. LIGHTOWLERS M.W. (2006). Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. *Parasitology*, **133**, S27–42.
30. LIGHTOWLERS M.W. & GOTTSTEIN B. (1995). Echinococcosis/hydatidosis: Antigens, immunological and molecular diagnosis. *In: Echinococcus and Hydatid Disease*, Thompson R.C.A. & Lymbery A.J., eds. CAB International, Wallingford, UK, 355–410.
31. LIGHTOWLERS M.W., LAWRENCE S.B., GAUCI C.G., YOUNG J., RALSTON M.J., MAAS D. & HEATH D.D. (1996). Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Int. J. Parasitol.*, **18**, 457–462.
32. LYMBERY A.J. (1995). Genetic diversity, genetic differentiation and speciation, in the genus *Echinococcus* Rudolphi 1801. *In: Echinococcus and Hydatid Disease*, Thompson R.C.A. & Lymbery A.J., eds. CAB International, Wallingford, UK, 51–87.
33. MATHIS A., DEPLAZES P. & ECKERT J. (1996). An improved test system for PCR-based specific detection of *Echinococcus multilocularis* eggs. *J. Helminthol.*, **70**, 219–222.
34. MATHIS A. & DEPLAZES P. (2006). Copro-DNA tests for diagnosis of animal taeniid cestodes. *Parasitol. Int.*, **55**, S87–90.
35. MATSUO K. & KAMIYA H. (2005). Modified sugar centrifugal flotation technique for recovering *Echinococcus multilocularis* eggs from soil. *J. Parasitol.*, **91**, 208–209.
36. McMANUS D.P. (2006). Molecular discrimination of taeniid cestodes. *Parasitol. Int.*, **55**, S31–S37.
37. McMANUS D.P. & BRYANT C. (1995). Biochemistry, Physiology and Molecular Biology of *Echinococcus*. *In: Echinococcus and Hydatid Disease*, Thompson R.C.A. & Lymbery A.J., eds. CAB International, Wallingford, UK, 135–182.
38. MOKS E., SAARMA U. & VALDMANN H. (2005). *Echinococcus multilocularis* in Estonia. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1973–1974.
39. MORISHIMA Y., TSUKADA H., NONAKA N., OKU Y. & KAMIYA M. (1999). Evaluation of coproantigen diagnosis for natural *Echinococcus multilocularis* infection in red foxes. *Jpn. J. Vet. Res.*, **46**, 185–189.
40. NAIDICH A., McMANUS D.P., CANOVA S.G., GUTIERREZ A.M., ZHANG W., GUARNERA E.A. & ROSENZVIT M.C. (2006). Patent and pre-patent detection of *Echinococcus granulosus* genotypes in the definitive host. *Mol. Cell. Probes*, **20**, 5–10.
41. NONAKA N., OKA M., KAMIYA M. & OKU Y. (2008). A latex agglutination test for the detection of *Echinococcus multilocularis* coproantigen in the definitive hosts. *Vet. Parasitol.*, (in press).
42. NONAKA N., TSUKADA H., ABE N., OKU Y. & KAMIYA M. (1998). Monitoring of *Echinococcus multilocularis* infection in red foxes in Shiretoko, Japan, by coproantigen detection. *Parasitology*, **117** (Pt 2), 193–200.
43. RAUSCH R.L. (1995). Life cycle patterns and geographical distribution of *Echinococcus* species. *In: Echinococcus and Hydatid Disease*, Thompson R.C.A. & Lymbery A.J., eds. CAB International, Wallingford, UK, 89–134.

44. ROSENZVIT M.C., ZHANG L.H., KAMENETZKY L., CANOVA S.G., GUARNERA E.A. & McMANUS D.P. (1999). Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology*, **118**, 523–530.
45. SAKAI H., NONAKA N., YAGI K., OKU Y. & KAMIYA M. (1998). Coproantigen detection in a survey of *Echinococcus multilocularis* infection among red foxes, *Vulpes vulpes schrencki*, in Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **60**, 639–641.
46. SAKASHITA M., SAKAI H., KOHNO H., OOI H., OKU Y., YAGI K., ITO M. & KAMIYA M. (1995). Detection of *Echinococcus multilocularis* coproantigens in experimentally infected dogs using murine monoclonal antibody against adult worms. *Jpn J. Parasitol.*, **44**, 413–420.
47. STEFANIC S., SHAIKENOV B.S., DEPLAZES P., DINKEL A., TORGERSON P.R. & MATHIS A. (2004). Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* ('sheep strain') in naturally infected dogs. *Parasitol. Res.*, **92**, 347–351.
48. STIEGER C., HEGGLIN D., SCHWARZENBACH G., MATHIS A. & DEPLAZES P. (2002). Spatial and temporal aspects of urban transmission of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology*, **124** (Pt 6), 631–640.
49. THIENPONT D., ROCHETTE F. & VANPARIJS O.F.J. (1979). Diagnosing helminthiasis by coprological examination. Janssen Research Foundation, Beerse, Belgium.
50. THOMPSON R.C.A. (1995). Biology and systematics of *Echinococcus*. In: *Echinococcus* and Hydatid Disease, Thompson R.C.A. & Lymbery A.J., eds. CAB International, Wallingford, UK, 1–50.
51. THOMPSON R.C.A. & McMANUS D.P. (2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol.*, **18**, 452–457.
52. TRACHSEL D., DEPLAZES P. & MATHIS A. (2007). Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. *Parasitology*, **134**, 911–920.
53. TORGERSON P.R. & HEATH D.D. (2003). Transmission dynamics and control options for *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, **127**, S143–S158.
54. VAN DER GIESSEN J.W., ROMBOUT Y.B., FRANCHIMONT J.H., LIMPER L.P. & HOMAN W.L. (1999). Detection of *Echinococcus multilocularis* in foxes in The Netherlands. *Vet. Parasitol.*, **82**, 49–57.
55. VARCASIA A., CANU S., KOGKOS A., PIPIA A.P., SCALA A., GARIPPA G. & SEIMENIS A. (2007). Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in sheep and goats of Peloponnesus, Greece. *Parasitol. Res.*, **101**, 1135–1139.
56. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)/OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (2001). WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern, Eckert J., Gemmell, M.A., Meslin F.-X., Pawlowski Z.S., eds. OIE (World Organisation for Animal Health), Paris, France, 1–265.
57. XIAO N., QIU J., NAKAO M., LI T., YANG W., CHEN X., SCHANTZ P.M., CRAIG P.S. & ITO A. (2005). *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int. J. Parasitol.*, **35**, 693–701.
58. XIAO N., QIU J., NAKAO M., LI T., YANG W., CHEN X., SCHANTZ P.M., CRAIG P.S. & ITO A. (2006). *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: Discovery and epidemiological implications. *Parasitol. Int.*, **55**, S233–236.
59. ZHANG L.H., JOSHI D.D. & McMANUS D.P. (2000). Three genotypes of *Echinococcus granulosus* identified in Nepal using mitochondrial DNA markers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **94**, 258–260.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour l'Echinococcose/Hydatidose (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

FIÈVRE APHTEUSE

RÉSUMÉ

La fièvre aphteuse (FA) est la plus contagieuse des maladies des mammifères, qui peut entraîner des pertes économiques très graves chez les bi-ongulés réceptifs. Il existe sept sérotypes du virus de la FA appelés O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3 et Asia 1. L'infection avec un sérotype ne confère pas de protection contre les autres sérotypes. Cliniquement, la FA ne peut pas être différenciée des autres maladies vésiculaires que sont la maladie vésiculeuse porcine (MVP), la stomatite vésiculeuse (SV) et l'exanthème vésiculeux (EV). En conséquence le diagnostic de laboratoire devient urgent en cas de découverte ou de suspicion de foyer.

*Les cas typiques de FA sont caractérisés par l'apparition de vésicules au niveau des onglons, de la muqueuse buccale et du pis. Les signes cliniques peuvent être bénins ou graves, et dans ce dernier cas la mort peut s'en suivre notamment chez les jeunes animaux. Chez certaines espèces sauvages, l'infection peut rester sub-clinique, par exemple chez le buffle africain (*Syncerus caffer*). Le tissu à privilégier pour le diagnostic est l'épithélium de vésicules non rompues ou récemment rompues ou encore le liquide vésiculaire lui-même. Quand cela est impossible le sang et/ou le liquide oesophago-pharyngé, prélevé à l'aide d'une curette œsophagienne (« Probang test») chez les ruminants ou par écouvillonnage pharyngé chez le porc, constituent une autre source possible de virus. Des prélèvements de myocarde ou de sang peuvent être réalisés sur des animaux ayant succombé à la maladie, mais lorsqu'elles existent les vésicules resteront toujours le prélèvement de choix.*

Il est très important que les prélèvements provenant des cas suspects soient transportés dans des conditions de sécurité conformes aux réglementations internationales. Le laboratoire de destination doit toujours être un établissement agréé.

Le diagnostic de la FA est réalisé par isolement du virus ou par démonstration de la présence des antigènes ou de l'acide nucléique du virus causal dans les tissus ou les liquides biologiques. La détection des anticorps spécifiques circulants peut aussi être utilisée pour le diagnostic. Les anticorps dirigés contre les protéines virales non structurales (PNS) peuvent être considérés comme des indicateurs de l'infection indépendants du statut vaccinal de l'animal.

Identification de l'agent pathogène : *la démonstration de la présence d'antigène ou d'acide nucléique viral est suffisante pour confirmer un diagnostic de FA. En raison de la nature très contagieuse de la maladie et de son importance économique, le diagnostic de laboratoire du virus responsable et la détermination de son sérotype doivent être réalisés par un laboratoire répondant aux normes de confinement de l'OIE pour les agents pathogènes de type 4.*

La fixation du complément (FC) a été remplacée dans la plupart des laboratoires par la réaction immuno-enzymatique (ELISA) jugée plus spécifique et plus sensible et non faussée par les composés pro ou anti-complémentaires. Si le prélèvement n'est pas bon ou si l'épreuve n'est pas concluante, le matériel prélevé devra être inoculé à des cellules sensibles ou à des souriceaux non sevrés de 2 à 7 jours, pour augmenter la quantité de virus éventuellement présente. On utilisera de préférence des cellules primaires de thyroïde de bovin (veaux), mais des cellules de reins d'agneau, de veau ou de porc ainsi que des cellules de lignée de sensibilité comparable conviennent également. Quand l'effet cytopathogène (ECP) est visible sur tout le tapis cellulaire, les surnageants de culture peuvent être testés par FC, ELISA ou la technique de la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR). Les mêmes épreuves peuvent être réalisées avec des broyats homogénéisés de muscles striés de souriceaux morts après inoculation.

Les épreuves de reconnaissance de l'acide nucléique viral comme la RT-PCR sont de plus en plus utilisées comme méthodes rapides et sensibles de diagnostic. L'examen en microscopie électronique de fragments de lésions est parfois aussi employé pour différencier la FA de maladies causées par d'autres virus.

Épreuves sérologiques : la démonstration de la présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre les protéines virales structurales chez des animaux non vaccinés porteurs d'aphtes, est suffisant pour porter un diagnostic. Ceci est particulièrement utile dans les formes bénignes de la maladie ou quand il n'y a pas d'épithélium à prélever. La recherche d'anticorps anti-PNS est utile pour confirmer une réplication virale passée ou actuelle, et ceci quel que soit le statut vaccinal de l'hôte. Les PNS, à l'inverse des protéines structurales, sont hautement conservées et ne sont donc pas spécifiques de sérotype, ce qui fait que la détection des anticorps dirigés contre elles ne permet pas de savoir quel est le sérotype de l'agent causal.

La neutralisation virale (NV) et le test ELISA, qui détectent les anticorps dirigés contre les protéines structurales, sont des tests sérologiques utilisés pour typer les virus. Les résultats de la NV sont dépendants des cultures cellulaires et donc moins constants que ceux de l'ELISA ; ils sont aussi plus longs à obtenir et peuvent être faussés par les contaminations. La méthode ELISA est plus rapide et ne nécessite pas de cultures cellulaires. Comme elle peut utiliser des antigènes inactivés, elle permet de travailler dans un confinement biologique moins contraignant.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : des vaccins à virus inactivés de diverses compositions sont mis sur le marché. Ces vaccins sont généralement obtenus en cultivant le virus sur un tapis cellulaire ou en suspension cellulaire. La préparation finale est clarifiée, inactivée avec de l'éthylène-imine et mélangée à des adjuvants de l'immunité. La plupart des vaccins de la FA sont multivalents, de façon pour conférer une protection contre plusieurs des sérotypes prévalant dans une région donnée.

Le produit final doit être exempt de virus résiduel virulent. Les tests in vitro réalisés sur les préparations concentrées de virus inactivés avant la formulation du vaccin sont les mieux à même d'en apporter la démonstration. L'absence de virus non inactivé est ensuite vérifiée par des épreuves in vivo ou in vitro réalisées sur le produit final. Des épreuves virulentes sont aussi réalisées sur bovins vaccinés pour établir la dose protectrice 50 % (DP₅₀) ou vérifier que le vaccin protège bien contre une infection podale généralisée, bien qu'une épreuve sérologique puisse être considérée comme suffisante quand la corrélation entre protection observée et niveau en anticorps spécifiques a été validée.

Les établissements fabricant les vaccins de la FA doivent également satisfaire aux exigences de l'OIE pour le confinement biologique de niveau 4 des agents pathogènes.

Les réactifs de référence et de diagnostic peuvent être fournis par les Laboratoires de référence de l'OIE pour la FA ou par le Laboratoire mondial de référence pour la FA de la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) qui est situé à Pirbright. En matière de FA, le laboratoire de Pirbright est à la fois Laboratoire mondial de référence de la FAO et Laboratoire de référence de l'OIE.

A. INTRODUCTION

La fièvre aphteuse (FA) est causée par un virus du genre *Aphthovirus*, famille des *Picornaviridae*. Il existe sept sérotypes appelés O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3, et Asia 1, qui infectent les ongulés artiodactyles. L'infection par un sérotype n'induit pas d'immunité contre un autre sérotype. Plusieurs souches peuvent être identifiées par des méthodes biochimiques et immunologiques au sein d'un même sérotype.

En Afrique, Les virus de la FA persistent chez les bovins et les buffles africains (*Syncerus caffer*), ces derniers en étant les hôtes les plus habituels. Il a été démontré que d'autres espèces domestiques ou sauvages pouvaient être infectées, mais sans que l'infection puisse se maintenir plus de quelques mois en l'absence de bovins ou de buffles africains. Ailleurs dans le monde, les bovins sont habituellement le réservoir principal du virus, bien que parfois les virus en cause puissent alors apparaître très spécifiquement adaptés aux porcs domestiques ou aux ovins et caprins. Il est probable que ces virus adaptés sont capables de modifier leur adaptation pour affecter d'autres espèces s'ils en ont l'opportunité. Cependant la souche de virus dite Cathay, adaptée au porc, n'infecte pas de manière apparente les grands ruminants ni naturellement ni expérimentalement, et ne peut se multiplier

que sur des cellules primaires de porc. En dehors d'Afrique, les animaux sauvages se sont montrés jusqu'à maintenant incapables de d'assurer la persistance de la FA. Il a été prouvé que l'infection des chevreuils, signalée par le passé, a toujours été la conséquence d'un contact direct ou indirect avec des animaux domestiques.

Parmi les espèces domestiques, les bovins, porcins, ovins et caprins ainsi que les buffles d'eau (*Bubalis bubalis*) sont sensibles à la FA (30). De plus, beaucoup d'ongulés sauvages artiodactyles, comme les cervidés, les antilopes et divers suidés sauvages peuvent être infectés, mais leur responsabilité dans l'épidémiologie de la FA n'a pas été avérée, contrairement à celle des buffles africains. Des souches de virus de la FA infectant des bovins ont été isolées aussi de suidés sauvages et de cervidés. Les méthodes de diagnostic de la FA chez les espèces sauvages sont les mêmes que celles décrites pour les animaux domestiques.

L'infection des animaux sensibles par le virus de la FA se traduit par l'apparition de vésicules au niveau des onglons, dans et autour de la cavité buccale ainsi qu'au niveau de la glande mammaire chez les femelles. Les lésions du bourrelet coronaire peuvent entraîner un arrêt de sa croissance, dont la marque à partir de la base de l'onglon permet de dater le début de l'infection. L'animal peut perdre ses onglons en cas d'infections podales graves. La mammite est une conséquence classique de la fièvre aphteuse chez la vache laitière. Les vésicules peuvent aussi apparaître en d'autres points comme dans l'intérieur des naseaux, et sur les points d'appui des pattes, surtout chez les porcs. La gravité des symptômes varie selon les souches virales, la dose infectante, l'âge et la race des animaux ainsi qu'avec leur degré d'immunité (44). Ces symptômes peuvent aller d'une infection inapparente ou bénigne jusqu'à l'infection grave. La mort peut survenir dans certains cas. La mortalité par myocardite multifocale étant le plus souvent observée chez les jeunes animaux ; une myosite peut aussi survenir en d'autres points.

Dans les élevages où sont morts brutalement de jeunes bi-ongulés, un examen attentif des adultes peut souvent révéler la présence de lésions vésiculaires en cas de FA. La présence d'aphtes n'est pas systématique dans les cas mortels.

Chez les animaux ayant souffert de maladies vésiculeuses, la détection du virus de la FA dans les prélèvements de liquide vésiculaire, de tissus épithéliaux, de prélèvement oesophago-pharyngé (« Probang test »), de lait ou de sang est suffisante pour poser un diagnostic. Dans les cas mortels, le diagnostic peut aussi être assuré par l'isolement du virus à partir du sang, du cœur ou d'autres organes. Dans un certain nombre de cas mortels, une myocardite (« cœur tigré ») peut être observée à l'œil nu.

Le virus de la FA peut se répliquer dans, et être excrété par, l'appareil respiratoire des animaux. L'excrétion aérienne du virus se produit durant la phase aiguë de l'infection. Les virus de la FA peuvent être retrouvés dans toutes les sécrétions et excréments, y compris dans l'air expiré des animaux infectés en phase aiguë. La transmission est généralement assurée par contact direct entre animaux sensibles, d'infectés à sains ou plus rarement par l'exposition des sujets sensibles aux excréments et sécrétions des animaux infectés en phase aiguë. Après guérison d'une infection aiguë, le virus infectieux disparaît de toutes les sécrétions et excréments à l'exception notable des sécrétions oesophago-pharyngées de certains ruminants, dans lesquelles le virus peut survivre. Les animaux chez lesquels le virus persiste dans le liquide oesophago-pharyngé pendant plus de 28 jours après infection sont appelés porteurs de virus. Les porcs ne deviennent jamais porteurs de virus. Il a parfois été démontré que les porteurs de virus, et notamment les buffles africains pouvaient dans certains cas transmettre l'infection à des animaux sensibles venus à leur contact : le mécanisme de cette transmission est inconnu. Le portage du virus ne dure pas plus de 6 mois chez les bovins, exceptionnellement 3 ans. Certains buffles africains sont restés porteurs de virus pendant 5 ans, mais ce portage ne doit probablement pas durer toute leur vie. Au niveau du troupeau, le virus peut persister pendant 24 ans ou plus. On ignore la durée du portage chez un autre buffle domestique, le buffle d'eau d'Asie du Sud-Est. En règle générale cet animal, ainsi que les ovins et les caprins, n'hébergent pas le virus de la FA plus de quelques mois.

Du fait du caractère hautement contagieux et de l'importance économique de la FA, le diagnostic et l'identification des sous-types du virus doivent être effectués dans des installations qui répondent aux exigences pour le confinement de niveau 4 des agents pathogènes, telles qu'elles sont exposées dans le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries » de ce *Manuel terrestre*. Les pays qui ne disposent pas de telles installations spécialisées nationales ou régionales doivent envoyer leurs prélèvements à un Laboratoire de référence de l'OIE pour la fièvre aphteuse répondant aux exigences pour le confinement des agents pathogènes du groupe 4. Les installations de production de vaccins de la fièvre aphteuse doivent également satisfaire à ces exigences.

Des réactifs de diagnostic normalisés peuvent être fournis avec un kit, ou sous forme séparée, par les laboratoires de référence de l'OIE pour la FA. L'emploi d'antigènes inactivés dans la méthode immuno-enzymatique (ELISA) soit comme témoins dans l'épreuve de détection de l'antigène, soit pour réagir avec les sérums à tester par ELISA de blocage compétitif en phase liquide ou solide, réduit le risque lié à l'utilisation de virus vivants. Les réactifs sont délivrés sous forme lyophilisée, ou en liquide glycérolé, ou congelés sans glycérol. Dans ces conditions, ils peuvent rester stables plusieurs années à des températures situées

respectivement entre +1 °C et +8 °C, –30 °C et –5 °C, et –90 °C et –50 °C. L'Agence internationale de l'énergie atomique a publié un manuel où figurent les tests recommandés et les protocoles de contrôle de qualité.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Pour le diagnostic de laboratoire, le tissu de choix est l'épithélium ou le liquide vésiculaire. L'idéal est de recueillir au moins 1 g de tissu épithélial d'une vésicule non rompue ou récemment rompue, que l'on trouve d'ordinaire sur la langue, la muqueuse buccale ou les pieds. Pour éviter toute blessure aux personnes en charge de la collecte des prélèvements, et toute souffrance aux animaux, il est recommandé d'administrer un tranquillisant à ces animaux avant d'effectuer le prélèvement.

Les morceaux d'épithélium doivent être placés dans un milieu de transport composé à parties égales de glycérol et de tampon phosphate 0,04 M à pH 7,2 -7,6, de préférence additionné d'antibiotiques (pénicilline [1 000 Unités Internationales (UI)], sulfate de néomycine [100 UI], sulfate de polymyxine B [50 UI], mycostatine [100 UI]). A défaut de tampon phosphate 0,04 M, on peut employer du milieu de culture ou un tampon phosphate (PBS), l'important étant que le pH final du mélange glycérol/tampon se situe dans la gamme 7,2-7,6. Le virus de la FA étant extrêmement labile à pH bas, il est indispensable pour le succès du prélèvement que son milieu de transport contienne un tampon. Les prélèvements doivent être réfrigérés ou conservés sous glace jusqu'à l'arrivée au laboratoire.

Quand on ne peut recueillir de tissu épithélial chez les ruminants, par exemple chez les animaux très atteints ou convalescents ou quand l'infection est suspectée en l'absence de signes cliniques, des échantillons de fluide oesophago-pharyngé (sputum), peuvent être collectés avec une curette « probang » ou chez les porcs par écouvillonnage de la gorge. Ces échantillons seront envoyés au laboratoire en vue de l'isolement du virus ou de la réalisation d'une transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR). Le virus peut être également isolé ou détecté par RT-PCR à partir du sérum. Pour les raclages de gorge chez les porcins, l'animal doit être maintenu sur le dos dans un berceau en bois, l'encolure en extension. À l'aide d'un outil approprié, par exemple une pince clamps chirurgicale, le prélèvement sera remonté dans l'arrière gorge et le pharynx.

Avant de prélever les liquides oesophago-pharyngés chez les bovins ou autres grands ruminants (par exemple les buffles), mettre dans un flacon d'une capacité de 5 ml environ, 2 ml de milieu de transport composé d'un tampon phosphate 0,08 M contenant 0,01 % d'albumine bovine, 0,002 % de rouge de phénol ainsi que des antibiotiques (1 000 unités/ml de pénicilline, 100 unités/ml de mycostatine, 100 unités/ml de néomycine et 50 unités/ml de polymyxine) le tout ajusté à pH 7,2. Le flacon doit résister à la congélation en glace carbonique (glace sèche) ou en azote liquide (39).

Le liquide oesophago-pharyngé est prélevé à l'aide d'une curette œsophagienne (Probang) introduite en passant sur la langue jusqu'à la cavité oro-pharyngée. Elle est ensuite vigoureusement poussée et retirée 5 à 10 fois entre la première portion de l'œsophage et l'arrière pharynx. Le but est de recueillir du liquide oro-pharyngé et en particulier les cellules épithéliales superficielles de cette zone, y compris celles la partie proximale de l'œsophage, des parois du pharynx, des cryptes amygdaliennes et de la surface du palais. Si le prélèvement ne contient pas assez de débris cellulaires, il faut recommencer.

Le liquide oesophago-pharyngé une fois collecté, le contenu de la curette Probang doit être transféré dans un flacon transparent à large col d'une capacité d'environ 20 ml. L'examen du liquide permet de vérifier qu'il contient bien des cellules. Ensuite 2 ml de ce liquide sont ajoutés au 2 ml du liquide de transport. L'ensemble est agité doucement et doit avoir un pH d'environ 7,6. Les prélèvements contaminés par le contenu du rumen peuvent être inutilisables en cultures cellulaires. Les prélèvements contaminés par du sang ne sont pas vraiment satisfaisants. Le prélèvement peut être répété après rinçage de la bouche et de la gorge de l'animal à l'eau ou au PBS. Lorsqu'une série de plusieurs animaux doit faire l'objet d'un prélèvement, la curette utilisée doit être nettoyée et désinfectée entre chaque prélèvement. Dans ce but, la curette doit être rincée à l'eau du robinet, puis plongée dans un produit désinfectant approprié (par exemple 0,5 % [poids/volume] d'acide citrique en eau du robinet), le désinfectant étant ensuite éliminé par lavage à l'eau avant tout prélèvement sur un autre animal.

Les prélèvements oesophago-pharyngés des petits ruminants sont collectés dans 2 ml de liquide de transport préalablement placés dans un flacon de 20 ml à large col, le contenu de la curette étant rincé dans ce liquide pour y transférer le prélèvement oesophago-pharyngé. Le mélange est ensuite transféré dans un flacon de transport de 5 ml environ résistant à la congélation en glace carbonique (glace sèche) ou en azote liquide (39).

Les prélèvements oesophago-pharyngés doivent être réfrigérés ou congelés immédiatement après collecte. Si l'on doit les garder en attente plus de quelques heures, il vaut mieux les congeler en les plaçant sur de la glace carbonique ou dans l'azote liquide. Avant d'être congelés les flacons doivent être fermés avec précaution en utilisant des bouchons à vis étanches à l'air ou en silicone. Ceci est particulièrement important quand de la glace

carbonique est utilisée comme réfrigérant, car si le CO₂ pénètre dans le flacon contenant le prélèvement il peut faire baisser le pH et inactiver le virus éventuellement présent. Les flacons de verre ne doivent pas être utilisés s'ils présentent le risque d'exploser à la décongélation après que de l'azote liquide ait pénétré à l'intérieur. Les prélèvements doivent arriver au laboratoire préférentiellement sous forme congelée ou, si c'est impossible, sous forme réfrigérée.

Des précautions spéciales sont requises pour expédier du matériel biologique pouvant contenir du virus de la FA que ce soit à l'intérieur d'un pays ou entre pays. Le règlement pour les articles dangereux (DGR pour Dangerous Goods Regulation), développé par l'Association internationale du transport aérien (IATA pour International Air Transport Association), décrit les exigences très précises à respecter pour l'emballage et l'envoi des prélèvements pour le diagnostic via les lignes commerciales aériennes. Ceci est résumé au Chapitre 1.1.1., « Prélèvement et expédition des échantillons pour le diagnostic ».

1. Identification de l'agent pathogène

Plusieurs types de prélèvements peuvent être analysés pour isoler le virus ou le détecter par RT-PCR, notamment l'épithélium, les produits de racleage oro-pharyngés ou le sérum. Si la méthode ELISA n'est pas assez sensible pour un examen direct de prélèvements oro-pharyngés ou de sérum, elle convient bien en revanche pour détecter les traces du virus dans un épithélium en suspension, dans du liquide vésiculaire ou dans un surnageant de culture cellulaire.

a) Isolement viral

Les prélèvements épithéliaux doivent être extraits du tampon PBS glyciné de transport, puis séchés sur du papier buvard pour éliminer le glycérol qui est toxique pour les cultures cellulaires, et enfin pesés. Une suspension est préparée par broyage du prélèvement au pilon dans un mortier contenant du sable stérile en présence d'un petit volume de milieu de culture cellulaire additionné d'antibiotiques. Du milieu de culture devra ensuite être ajouté jusqu'à obtention d'un volume final égal à neuf fois la quantité initiale utilisée avec le prélèvement (suspension finale à 10 %). Le tout est clarifié par centrifugation à 2 000 *g* pendant 10 min. Après clarification, les suspensions suspectées de contenir du virus de la FA sont inoculées en cultures cellulaires ou à des souriceaux nouveau-nés.

Parmi les systèmes de cultures cellulaires sensibles, on peut citer les cellules primaires de thyroïde bovine (veau) ainsi que les cellules primaires rénales de porc, veau ou agneau. Des lignées de cellules comme BHK-21 (Baby Hamster Kidney) et IB-RS-2 peuvent aussi être utilisées, mais elles sont généralement moins sensibles que les cellules primaires à de petites quantités de matériel infectieux (19). La sensibilité de toute cellule utilisée pour l'isolement du virus doit être vérifiée en utilisant une préparation de référence de virus de la FA. Le recours aux cellules IB-RS-2 permet de différencier la maladie vésiculeuse du porc de la FA (puisque le virus de la maladie vésiculeuse du porc ne se réplique que sur ce type de cellules) et il est en outre essentiel pour isoler des souches du virus de la FA adaptées au porc, telle que la souche O Cathay. Les cultures cellulaires doivent être examinées pendant 48 h pour rechercher un effet cytopathogène (ECP) éventuel. Si aucun ECP n'est détecté, les cellules sont congelées puis décongelées puis utilisées pour inoculer une culture cellulaire fraîche qui sera à nouveau observée 48 h à la recherche d'un ECP éventuel. Les souriceaux nouveau-nés sont une alternative aux cultures cellulaires. Ils doivent être âgés de 2 à 7 jours et de souches consanguines sensibles. Certains virus sauvages nécessitent plusieurs passages avant de s'adapter aux souriceaux (58). Dans le cas des liquides oesophago-pharyngés, un prétraitement avec un volume égal de chloro-fluoro-carbones peut faciliter la détection des virus en les libérant des immunocomplexes.

b) Méthodes immunologiques

• Méthode immuno-enzymatique

La méthode préférée de détection des antigènes du virus de la FA et d'identification de ses sérotypes est la méthode ELISA (28, 53). C'est une épreuve sandwich indirecte dans laquelle des anti-sérums de lapin dirigés contre les 7 sérotypes du virus tapissent les puits de différentes rangées d'une microplaque. Ce sont les sérums de capture des virus. Les suspensions de prélèvements sont ajoutées à chacune des rangées, ainsi que les témoins appropriés. Un sérum hyperimmun de cobaye spécifique de chacun des sérotypes de virus de la FA est ensuite ajouté, suivi par un sérum de lapin anti-sérum de cobaye conjugué à une enzyme. Les puits sont soigneusement rincés entre chacune de ces opérations pour enlever les réactifs non fixés. Si le virus est présent, une réaction colorée se produira après addition du substrat de l'enzyme et du chromogène. Une réaction fortement positive est évidente à l'œil nu, mais peut aussi se lire au spectrophotomètre à une longueur d'onde appropriée. Dans ce dernier cas, une absorption supérieure de 0,1 à celle du bruit de fond indique une réaction positive et précise le sérotype impliqué. Les valeurs proches de 0,1 doivent être confirmées par une seconde épreuve ou par multiplication du virus sur cellules et épreuve sur le surnageant si un ECP est observé. Un protocole pratique est fourni plus loin. Il existe d'autres protocoles qui présentent de légères différences de méthodes et de critères d'interprétation (3, 6).

Selon les espèces affectées et l'origine géographique des prélèvements il peut être bon de faire une épreuve simultanée pour la maladie vésiculeuse du porc (MVP) ou pour la stomatite vésiculeuse (SV). Un diagnostic différentiel complet devrait d'ailleurs être entrepris avec toutes les maladies vésiculeuses.

Un sérum de lapin dirigé contre les particules 146S de chacun des 7 sérotypes du virus FA (ainsi que les virus de la MVP et de la SV si nécessaire) est utilisé comme anticorps de capture à une concentration optimale prédéterminée en tampon carbonate/bicarbonate, pH 9,6.

Des témoins antigènes sont préparés à partir de cultures cellulaires de souches sélectionnées pour chacun des 7 sérotypes du virus de la FA (ainsi que les virus de la MVP et de la SV si c'est approprié). Le virus de la FA sera répliqué sur cellules BHK-21 et les virus MVP et SV sur cellules IB-RS-2. Les surnageants non purifiés sont utilisés et pré-titrés sur des plaques ELISA. La dilution finale choisie est celle absorbant au sommet de la partie linéaire de la courbe de titrage (densité optique aux environs de 2,0). Ainsi les dilutions de raison 5 des témoins antigènes utilisés dans l'épreuve donnent-ils les 2 valeurs les plus basses en densité optique dont est dérivée la courbe de titrage. Du tampon PBS contenant 0,05 % de Tween-20 et du rouge de phénol comme indicateur, est utilisé comme diluant (PBST).

Un anti-sérum, préparé sur cobaye par inoculation de particules 146S d'un des 7 sérotypes du virus de la FA (et du virus de la MVP si nécessaire) et prébloqué avec du sérum bovin normal, est utilisé comme anticorps détecteur. Des dilutions optimales et prédéterminées en sont préparées en PBS contenant 0,05 % de Tween-20 et 5 % de poudre de lait écrémé (PBSTM).

Des immunoglobulines de lapin ou de mouton anti-cobaye, conjuguées à la peroxydase de raifort et prébloquées avec du sérum bovin normal sont utilisées diluées en PBSTM à une concentration optimale prédéterminée. Une alternative à l'utilisation des immunoglobulines est l'utilisation d'anticorps monoclonaux (AcMs) qui peuvent être fixés à la plaque ELISA comme anticorps de capture ou conjugués à la peroxydase comme anticorps de détection.

• **Protocole**

- i) Les puits des plaques ELISA sont sensibilisés avec du sérum de lapin anti-virus dilué en tampon carbonate/bicarbonate 0,05 M de pH 9,6 à raison de 50 µl par puits. Les rangées A à H reçoivent respectivement l'anti-sérum dirigé contre les sérotypes O, A, C, Asia 1, SAT 1, SAT 2, SAT 3 ainsi que contre le virus de la MVP et de la VS (optionnel) ;
 - ii) Laisser les plaques reposer une nuit à 4 °C, ou les placer dans une étuve à 37 °C pendant 1 h sur un agitateur orbital réglé sur 100 à 120 tr/min ;
 - iii) Préparer la suspension du prélèvement à tester (suspension à 10 % du prélèvement original ou surnageant de culture cellulaire du virus, clarifié non dilué) ;
 - iv) Les plaques ELISA sont lavées 5 fois avec du PBS ;
 - v) Dans chaque plaque, ajouter dans chaque puits des colonnes 4, 8 et 12 un volume de 50 µl de PBST. Ensuite ajouter 50 µl de PBST aux puits 1, 2 et 3 des rangées A à H de la plaque N°1. Au puits 1 de la rangée A de la plaque N°1 ajouter 12,5 µl d'antigène témoin de type O, et dans le puits 1 de la rangée B ajouter 12,5 µl d'antigène témoin de type A. Répéter de la même façon pour les antigènes témoins des virus de la FA de type C, Asia 1, SAT 1, SAT 2, SAT 3 (ainsi que pour les virus de la MVP et de SV, si on le juge utile), dans le puits n°1 appartenant respectivement aux rangées C à H. Rajouter du diluant dans les puits 1 des rangées A à H et transférer 12,5 µl du puits 1 à 2 (rangées A à H) , mélanger et transférer 12,5 µl des puits 2 à 3 et rejeter 12,5 µl du puits 3 (rangées A à H) : les séries de chacun des antigènes témoins sont donc diluées au 1/5. Il faut seulement changer les pointes de micro-pipette entre chaque antigène. Le reste de la plaque peut être tapissé avec le (les) prélèvement(s) à tester. Ajouter 50 µl des prélèvements aux puits 5, 6 et 7 des rangées A à H, le second prélèvement étant déposé de la même façon dans les colonnes 9, 10 et 11 des rangées A à H.
- Si plus de deux prélèvements sont à tester en même temps, les autres plaques ELISA doivent être utilisées comme suit :
- Répartir 50 µl de PBST dans les puits des colonnes 4, 8 et 12 (colonnes des témoins tampon) au niveau des rangées A à H. Noter que des témoins antigènes ne sont pas nécessaires pour ces plaques. Ces prélèvements à tester peuvent être ajoutés sous un volume de 50 µl dans les rangées A à H respectivement pour les colonnes 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10 et 11 ;
- vi) Couvrir la plaque et la placer sur un agitateur orbital à 37 °C pendant 1 h ;
 - vii) Recouvrir les plaques de PBS et les laver 3 fois comme précédemment, rejeter le liquide de rinçage et sécher complètement les plaques ;

- viii) Transférer 50 µl de chaque dilution de sérum de cobaye dans chaque puits de la plaque et dans l'ordre approprié les rangées A à H recevant par exemple respectivement les anti-sérums O, A, C, Asia 1, SAT 1, SAT 2, SAT 3 ainsi que anti-MVP et anti-VS (optionnel) ;
- ix) Recouvrir les plaques et les replacer sur l'agitateur orbital et incubé à 37 °C pour 1 h ;
- x) Les plaques sont lavées de nouveau trois fois, et 50 µl de sérum de lapin anti-immunoglobulines de cobaye conjugué à la peroxydase de raifort sont ajoutés à chaque puits. Les plaques sont incubées à 37 °C pendant 1 h sur un agitateur rotatif ;
- xi) Les plaques sont lavées encore 3 fois puis on ajoute à chaque puits 50 µl de la solution de substrat contenant 0,05 % de H₂O₂ avec de l'orthophénylène-diamine ou un autre chromogène approprié ;
- xii) La réaction est arrêtée après 15 min par addition de 50 µl d'acide sulfurique 1,25 M. Les plaques sont lues à la longueur d'onde de 492 nm grâce à un spectrophotomètre que l'on peut relier à un ordinateur.

- **Fixation du complément**

En général, l'ELISA est préférable à la réaction de fixation du complément (FC) parce que l'ELISA est plus sensible et n'est pas affecté par les pouvoirs anti ou pro-complémentaires. Faute de réactifs ELISA, la fixation du complément (FC) peut être pratiquée comme suit :

Les anti-sérums contre chacun des sept sérotypes du virus de la FA sont dilués dans du tampon véronal (TV) à partir d'une dilution initiale de 1/16 en suivant une progression de raison 1,5. Laisser 25 µl des dilutions sériques successives dans chaque puits en U d'une microplaque appropriée. À ces 25 µl sont ajoutés 50 µl de 3 unités de complément, suivis de 25 µl de la (les) suspension (s) à tester. Le système est ensuite incubé à 37 °C pendant 1 h, puis on ajoute 25 µl d'une suspension normalisée à 1,4 % de globules rouges de moutons (GRM) en TV eux-mêmes sensibilisés avec 5 unités de sérum hémolytique de lapin. Les réactifs sont incubés à 37 °C pour encore 30 min et les plaques sont centrifugées, puis lues. Des témoins appropriés sont ajoutés pour les suspensions à tester, les anti-sérums, les cellules et le complément. Les titres en FC sont exprimés comme la réciproque de la dilution sérique produisant 50 % d'hémolyse. Un titre FC ≥ 36 est considéré comme positif. Les titres d'une valeur de 24 doivent être confirmés par une seconde épreuve utilisant l'amplification par passage en culture cellulaire du prélèvement en question.

c) Méthodes de reconnaissance de l'acide nucléique

La transcription inverse (RT) couplée à l'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) peut être utilisée pour amplifier des fragments de génome du virus de la FA dans des prélèvements adressés pour diagnostic, notamment dans de l'épithélium, du lait, du sérum ou des produits de raclage oro-pharyngés (7, 13). La RT combinée avec la PCR en temps réel a une sensibilité comparable à celle de l'isolement du virus (2, 51) et des méthodes automatisées facilitent le traitement du prélèvement (52). Des amorces spécifiques ont été réalisées pour distinguer entre chacun des 7 sérotypes. Des techniques d'hybridation *in situ* ont été développées pour la recherche de la présence de l'ARN du virus de la FA dans les fragments de tissus (63). Ces techniques ne sont utilisées que dans des laboratoires spécialisés, mais des méthodes simplifiées pouvant être utilisées sur le terrain sont en cours de développement (18).

- **Épreuve RT-PCR en gel d'agarose**

La méthode a été décrite par le Laboratoire de référence de l'OIE à Pirbright (50). Elle se déroule en trois étapes successives (i) extraction d'un échantillon ARN de l'échantillon témoin et du prélèvement à tester, puis (ii) RT de l'ARN extrait puis (iii) amplification par PCR du produit et enfin (iv) détection des produits d'amplification par électrophorèse en gel d'agarose.

- **Protocole**

- i) Ajouter 200 µl du prélèvement à tester à 1 ml de TRIzol[®] Reagent placé dans un tube stérile. Conserver à -70 °C jusqu'à l'extraction de l'ARN.
- ii) Transférer 1 ml de la solution préparée en i) dans un autre tube stérile contenant 200 µl de chloroforme. Mélanger 10 à 15 s sur un vortex, puis laisser reposer 3 min à température ambiante.
- iii) Centrifuger 15 min à 20 000 g.
- iv) Transférer 500 µl de la phase aqueuse dans un nouveau tube stérile contenant 1 µl of glycogène (20 mg/ml) and ajouter 500 µl d'alcool isopropylique (« propan-2-ol »). Mélanger quelques secondes sur un vortex.
- v) Laisser reposer 10 min à température ambiante, puis centrifuger 10 min à 20 000 g.
- vi) Rejeter le liquide surnageant de chaque tube et ajouter 1 ml d'éthanol à 70 %. Mélanger quelques secondes sur un vortex.

- vii) Centrifuger 10 min à 20 000 *g*.
- viii) Enlever délicatement le surnageant du liquide présent dans chacun des tubes en prenant bien soin de ne pas disloquer ou perdre la moindre partie du culot.
- ix) Sécher chaque tube à l'air, à température ambiante, pendant 2 à 3 min.
- x) Remettre tous les culots en suspension en rajoutant 20 µl d'eau exempte de nucléase dans les tubes.
- xi) Conserver les échantillons d'ARN sur la glace si la RT est prête à être réalisée. Sinon, placer à –70 °C.
- xii) Pour chacun des échantillons à tester, ajouter 2 µl d'hexamères aléatoires (20 µg/ml) et 5 µl d'eau exempte de nucléase dans un microtube à centrifuger stérile de 0,5 ml. Il vaut mieux préparer la dilution groupée de tous les échantillons à tester, mais en gardant un échantillon de secours.
- xiii) Ajouter 5 µl d'ARN aux produits extraits précédemment de façon à obtenir un volume 12 µl dans chaque tube. Mélanger doucement en aspirant et refoulant à la pipette.
- xiv) Incuber 5 min à 70 °C
- xv) Refroidir à température ambiante pendant 10 min.
- xvi) Pendant cette incubation de 10 min, préparer le mélange de la réaction de RT décrite ci-dessous pour chaque prélèvement. Ce mélange sera réalisé en une seule fois dans un microtube à centrifuger stérile de 1,5 ml pour le nombre attendu de prélèvements à analyser, ainsi qu'un échantillon de secours.
 Tampon premier brin 5× conc. (4 µl); sérum albumine bovine (acétylée), 1 mg/ml (2 µl); dNTPs, 10 mM mélange de dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1 µl); DTT, 1 M (0,2 µl); Transcriptase murine réverse de Moloney (*Moloney Murine Reverse Transcriptase*), 200 U/ µl (1 µl).
- xvii) Ajouter 8 µl du mélange réactionnel aux 12 µl du mélange amorce/ARN. Mélanger doucement à la pipette.
- xviii) Incuber 45 min à 37 °C.
- xix) Laisser les produits de la RT reposer sur glace si l'étape d'amplification de la PCR est sur le point de débuter, sinon les congeler à –20 °C.
- xx) Préparer le mélange PCR décrit ci-dessous pour chaque échantillon. Il vaut mieux faire une préparation groupée pour l'ensemble des échantillons à tester, plus un échantillon de secours.
 Eau exempte de nucléase (35 µl); Tampon de réaction PCR, 10x conc (5 µl); MgCl₂, 50 mM (1,5 µl); dNTPs, 10 mM mélange de dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1 µl); amorce 1, 10 pmol/µl (1 µl); amorce 2, 10 pmol/µl (1 µl); *Taq* Polymérase, 5 unités/µl (0,5 µl).
- xxi) Ajouter 45 µl du mélange réactionnel PCR dans le puits d'une plaque PCR ou dans un microtube à centrifuger pour chaque prélèvement à tester, puis 5 µl du produit de la RT de façon à obtenir un volume final réactionnel de 50 µl.
- xxii) Placer la plaque ou les tubes 1 min dans une centrifugeuse adaptée, de façon à mélanger les contenus de chaque puits.
- xxiii) Placer la plaque dans un thermo-cycleur pour amplification par PCR et lancer le programme suivant :
 94 °C pendant 5 min : 1 cycle;
 94 °C pendant 1 min, 55 °C pendant 1 min, 72 °C pendant 2 min : 30 cycles;
 72 °C pendant 7 min : 1 cycle.
- xxiv) Mélanger une aliquote de 20 µl de chaque produit de la PCR à 4 µl de solution colorante et charger sur un gel d'agarose à 1,5 %. Après électrophorèse, le résultat est considéré comme positif s'il existe une bande de 328 pb correspondant à la séquence du virus de la FA dans la région non traduite 5' de son génome.

• Solutions de travail

- i) Eau exempte de nucléase, TRIzol[®] Reagent, chloroforme, glycogène, alcool iso-propylique (propan-2-ol), éthanol, amorces aléatoires d'hexanucléotide. Tampon premier brin, sérum albumin bovine (acétylée), dNTPs, DTT, Transcriptase réverse de souris Moloney (*Moloney Murine Reverse Transcriptase*), tampon de réaction (10×), MgCl₂ et *Taq* Polymérase peuvent être achetées dans le commerce.
- ii) Amorces à une concentration de 10 pmol/µl: Amorce 1, séquence 5'-GCCTG-GTCTT-TCCAG-GTCT-3' (brin positif); Amorce 2, séquence 5'-CCAGT-CCCCT-TCTCA-GATC-3' (brin négatif).

- **Épreuve de RT-PCR en temps réel**

La méthode décrite est celle utilisée au Laboratoire de référence de l'OIE à Pirbright. L'épreuve RT-PCR en temps réel emploie les mêmes techniques d'extraction de l'ARN de l'échantillon à tester ou du témoin, suivie d'une RT de l'ARN extrait comme dans la méthode classique sur gel d'agarose. L'extraction par automate de l'acide nucléique total des prélèvements, suivi du programme de pipetage automatique pour les étapes RT et PCR (52) peut constituer une alternative aux méthodes manuelles précédemment décrites. L'amplification par PCR du produit de la RT est réalisée par un procédé différent. Après une amplification en temps réel, la détection des produits de la PCR en gel d'agarose n'est pas nécessaire.

- Récupérer les produits de la RT obtenus lors de l'étape xix (voir ci-dessus).
- Préparer le mélange PCR décrit ci-dessous pour chaque prélèvement. Il est de nouveau recommandé de faire une préparation groupée correspondant au nombre total de prélèvements à analyser plus un échantillon de secours : eau exempte de nucléase (6 µl); mélange réactionnel de base de la réaction PCR, 2× conc. (12,5 µl); amorce sens positif de la PCR en temps réel 10 pmol/µl (2,25 µl); amorce sens négatif de la PCR en temps réel 10 pmol/µl (2,25 µl); sonde TaqMan®, 5 pmol/µl (1 µl).
- Ajouter 24 µl de mélange réactionnel PCR dans l'un des puits d'une plaque PCR pour chacun des prélèvements à analyser puis 1 µl du produit de la RT de façon à obtenir un volume final 25 µl.
- Placer la plaque 1 min dans une centrifugeuse adaptée pour mélanger les contenus de chaque puits.
- Placer la plaque dans un appareil pour amplification par PCR en temps réel et lancer le programme suivant :
50 °C pendant 2 min : 1 cycle;
95 °C pendant 10 min : 1 cycle ;
95 °C pendant 15 s, 60 °C pendant 1 min : 50 cycles.
- Lecture des résultats** : attribuer une valeur de cycle seuil (CS) à chacune des réactions de PCR en partant de la courbe d'amplification (fluorescence mesurée en fonction du nombre de cycle, différentes pouvant être obtenus pour un même type d'échantillons ; 51). Les valeurs de CT utilisées pour considérer que des prélèvements contiennent ou non du virus de la FA doivent être définies par chaque laboratoire en utilisant le matériel de référence approprié. C'est ainsi qu'au laboratoire de référence de l'OIE à Pirbright, les prélèvements négatifs et les échantillons témoins négatifs doivent avoir une valeur de CT supérieure à 50. Les prélèvements positifs et les échantillons témoins positifs doivent avoir une valeur de CT inférieure à 40. Les prélèvements qui se situent dans la fourchette 40-50 sont considérés comme « limite » et peuvent être de nouveau analysés. Les prélèvements provenant d'animaux très atteints présentent des valeurs de CT inférieures à 20 (51).

- **Solutions de travail pour épreuve de PCR en temps réel**

- L'eau exempte de nucléase et les solutions mères pour réaction de PCR en temps réel peuvent être achetées dans le commerce.
- L'une ou l'autre des deux amorces et jeux de sondes suivantes peuvent être utilisées pour la PCR du virus de la FA.

5'UTR (51) Amorce sens CACYT YAAGR TGACA YTGRT ACTGG TAC ; Amorce anti-sens : CAGAT YCCRA GTGWC ICITG TTA et sonde TaqMan® : CCTCG GGGTA CCTGA AGGGC ATCC.

3D (18) Amorce sens : ACTGG GTTTT ACAA CCTGT GA ; Amorce anti-sens : GCGAG TCCTG CCACG GA et sonde TaqMan® : TCCTT TGCAC GCCGT GGGAC.

- **Épidémiologie moléculaire**

L'épidémiologie moléculaire de la FA repose sur la comparaison des différences génétiques entre virus. Des dendrogrammes montrant les relations génomiques existantes entre les souches vaccinales et les souches sauvages ont été publiés pour les 7 sérotypes sur la base des séquences dérivées du gène 1D (codant la protéine virale VP1). L'amplification par la réaction de RT-PCR de l'ARN du virus de la FA, suivie par le séquençage nucléotidique reste la méthode actuellement préférée pour rassembler les données de séquences permettant ces comparaisons. Beaucoup de laboratoires ont développé ces techniques pour mener à bien ces études et les laboratoires de référence détiennent des bases de données contenant plus de 3 000 séquences partielles.

La méthode recommandée consiste à :

- Extraire l'ARN du virus de la FA directement de la suspension épithéliale ou d'un des premiers passages en culture cellulaire.

- ii) Réaliser une RT-PCR sur le gène 1D complet (ou, si l'on a qu'une partie du gène, la partie terminale 3' qui est la plus intéressante).
- iii) Déterminer la séquence nucléotidique du produit obtenu par PCR (ou au moins des 170 nucléotides à l'extrémité 3' de ce gène, nombre porté à 420 pour les types SAT).

Un protocole complet avec les séquences des amorces peut être fourni par les laboratoires de référence de l'OIE sur simple demande ou peut être téléchargé sur le World Wide Web URLs :

<http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/picornaviridae/apthovirus/fmd.htm>

<http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/SerManDid17.pdf>

2. Épreuves sérologiques

Les quatre objectifs principaux des épreuves sérologiques pour la FA sont : 1) de certifier un animal donné en vue de son importation ou de son exportation (c'est-à-dire pour le commerce) ; 2) de confirmer une suspicion de FA ; 3) de démontrer l'absence d'infection ; 4) de démontrer l'efficacité d'une vaccination. Pour démontrer l'absence d'infection, plusieurs approches sont à envisager selon que la population animale a été ou non vaccinée, et si elle a été vaccinée selon qu'elle l'a été dans le cadre d'une campagne d'urgence ou d'un programme normal de vaccination. Différentes épreuves et modalités d'interprétation de leurs résultats seront retenues en fonction des objectifs indiqués précédemment, et la validation de l'épreuve choisie devra prendre en compte cet objectif. C'est ainsi que les valeurs limite des seuils d'anticorps utilisées pour la surveillance sérologique du troupeau peuvent être différentes de celles adoptées pour certifier l'absence d'infection chez un animal qui fait l'objet d'un échange international.

Les épreuves sérologiques pour la FA sont de deux types ; celles qui détectent les anticorps dirigés contre les protéines structurales du virus (PS) et celles qui détectent les anticorps dirigés contre ses protéines non structurales (PNS).

Les épreuves PS sont spécifiques de sérotype et détectent les anticorps produits après une vaccination ou une infection ; Il s'agit par exemple des épreuves de neutralisation du virus (NV ; 32), d'ELISA de compétition en phase solide (ECPS ; 41, 46) et d'ELISA de blocage en phase liquide (EBPL ; 35, 36). Ces épreuves sont spécifiques de sérotypes et extrêmement sensibles à condition que le virus ou l'antigène utilisé corresponde très précisément aux souches existantes sur le terrain. Ce sont les épreuves prescrites pour les échanges internationaux et elles conviennent aussi bien pour confirmer une infection en cours ou une infection passée chez des animaux non vaccinés que pour apprécier l'immunité post-vaccinale sur le terrain. Pour l'épreuve de NV il faut disposer de cultures cellulaires, manipuler du virus vivant et attendre 2 à 3 jours pour obtenir un résultat. Les épreuves ELISA sont basées sur la compétition ou le blocage entre anticorps, qui sont polyclonaux ou monoclonaux spécifiques de sérotype. Elles sont plus rapides à mettre en œuvre et n'exigent ni cultures cellulaires ni virus vivant. Dans quelques rares cas, ces différents ELISA peuvent donner des réactions faussement positives. Une solution pour réduire le nombre de ces dernières consiste à réaliser d'abord un pré-tri des sérums par ELISA puis à confirmer les résultats positifs par NV. Les sérums de référence permettant de normaliser les épreuves sérologiques concernant les PS du virus de la FA de sérotypes et sous-types donnés peuvent être fournis par le Laboratoire de Pirbright.

La détection des anticorps dirigés contre les protéines non structurales (PNS) du virus FA a été utilisée pour identifier une infection passée ou présente par n'importe lequel des 7 sérotypes, que l'animal ait été vacciné ou non. Par conséquent, ces tests peuvent être utilisés pour confirmer une suspicion de FA et détecter une activité virale ou pour vérifier l'absence d'infection à l'échelle d'une population animale. Lorsqu'il s'agit de certification pour le commerce, ces tests ont l'avantage, par rapport aux méthodes de détection des PS, qu'ils n'ont pas à préciser le sérotype du virus en cause. Toutefois, il a été prouvé expérimentalement que des bovins, vaccinés puis éprouvés avec un virus vivant et reconnus infectés persistants, pouvaient ne pas être détectés par certains tests anti-PNS, ce qui conduisait à des résultats faussement négatifs (17). Ces épreuves mesurent les anticorps dirigés contre les PNS en utilisant des antigènes produits par des techniques de recombinaison dans plusieurs systèmes d'expression *in vitro*. Les anticorps dirigés contre les polyprotéines 3AB et 3ABC sont généralement considérés comme les indicateurs les plus fiables de l'infection (42). Chez les animaux possédant des anticorps dirigés contre 3AB et 3ABC, la présence d'anticorps dirigés contre une ou plusieurs autres PNS peut faciliter l'interprétation finale du test (14, 42). Toutefois, la spécificité du diagnostic peut être prise en défaut lorsque le vaccin administré aux animaux n'était pas pur. La présence de PNS dans certaines préparations vaccinales peut en effet conduire à considérer par erreur comme infectés des animaux vaccinés plusieurs fois. Les méthodes d'évaluation de la pureté d'un vaccin sont décrites dans ce Chapitre, à la section D.

Des sérums de référence internationaux permettant de détecter les PNS chez les bovins ont été préparés et sont disponibles au Laboratoire de référence de l'OIE, Panaftosa, PAHO/WHO. Des sérums de référence équivalents seront bientôt prêts pour les ovins et les porcins. Des séries de sérums bovins ont été rassemblées par les laboratoires de référence de l'OIE, permettant de comparer la sensibilité des tests PNS.

a) Neutralisation du virus (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

La micro épreuve de NV pour les anticorps du virus de la FA est réalisée sur cellules IB-RS-2, BHK-21, cellules rénales d'agneau ou cellules rénales de porc dans des microplaques à fond plat destinées aux cultures cellulaires.

Le stock de virus est cultivé sur tapis cellulaire et conservé à -20 °C après addition de 50 % de glycérol (le virus est stable au moins 1 an dans ces conditions). Les sérums sont inactivés à 56 °C pendant 30 min avant d'être analysés. Le sérum témoin de référence est celui d'un animal vacciné depuis 21 jours ou convalescent de FA. Un milieu de culture conseillé est le milieu complet de Eagle/LYH (solution saline équilibrée de Hanks avec extrait de levure et hydrolysate de lactalbumine), avec un tampon hepes et des antibiotiques.

L'épreuve utilise des volumes égaux de 50 µl.

• **Protocole**

- i) Partant d'une dilution au 1/4, les sérums sont dilués directement sur la plaque, de 2 en 2, en utilisant au moins 2 (de préférence 4) rangées de puits par sérum. Utiliser un volume de 50 µl ;
- ii) Le virus pré-titré est ajouté sous un volume de 50 µl. La suspension virale doit contenir environ 100 DICT₅₀/ml (doses infectieuses en culture de tissu 50 % par ml de culture). L'amplitude des variations admises peut aller de 32 à 320 DICT₅₀ ;
- iii) Les témoins comprennent un antisérum de référence de titre connu, un sérum négatif (= sans anticorps), un témoin pour les cellules, un pour le milieu de culture et un titrage du virus auquel on pourra se référer pour calculer *a posteriori* le titre qui aura été réellement utilisé lors de l'épreuve ;
- iv) Incuber à 37 °C pendant 1 h avec les plaques couvertes ;
- v) Une suspension à 10⁶ cellules/ml est préparée dans un milieu de croissance contenant 10 % de sérum bovin exempt d'anticorps du virus de la FA. Un volume de 50 µl de suspension cellulaire est ajouté dans chaque puits ;
- vi) Les plaques sont scellées avec un film laissant passer l'air et sont incubées à 37 °C pendant 2 à 3 jours. Une autre manière de procéder est d'utiliser des couvercles de plaques non hermétiques et de procéder à l'incubation de manière identique, mais dans une atmosphère avec 3 à 5 % de dioxyde de carbone ;
- vii) Les plaques peuvent être observées au microscope 2 jours plus tard. Elles sont habituellement fixées et colorées au 3^e jour écoulé. La fixation a lieu en 30 min dans une solution saline formolée à 10 %. Pour la coloration, les plaques sont immergées 30 min dans une solution de formol à 10 % et de bleu de méthylène à 0,05 % ou dans une solution de naphthalène bleu noir à 0,4 % [p/v] avec 8 % [p/v] d'acide citrique en tampon salin. Les plaques ensuite sont rincées sous le robinet ;
- viii) Les puits dans lesquelles a été observée une réaction positive (c'est-à-dire où le virus a été neutralisé et où les cellules sont restées intactes) sont visibles car colorées en bleu et les puits dans lesquelles aucune la réaction n'a eu lieu (où le virus n'a pas été neutralisé) sont vides et transparentes. Les titres sont exprimés en dilution finale du sérum pour laquelle il y a neutralisation du virus dans 50 % des puits avec le mélange sérum/virus(38). L'épreuve est considérée comme valide quand la quantité de virus utilisée dans chaque puits se situe dans la fourchette log₁₀ 1,5 - 2,5 DICT₅₀ et à condition que le titre du sérum positif de référence ne s'éloigne pas de plus de deux fois la valeur attendue ;
- ix) L'interprétation des épreuves peut varier selon les laboratoires en fonction du seuil final positif/négatif qui a été choisi. Les laboratoires doivent établir leurs propres critères par référence aux réactifs de référence qui peuvent être fournis par le Laboratoire de référence de l'OIE à Pirbright. En général, la réaction est considérée comme positive si la dilution finale du sérum neutralisant le virus est de 1/45 ou plus. Un titre inférieur à 1/16 est considéré comme négatif. Pour les certificats individuels d'animaux qui font l'objet d'échanges internationaux, les titres de 1/16 à 1/32 sont considérés comme douteux et il peut être nécessaire d'obtenir de nouveau des sérums pour refaire l'épreuve ; si leur titre est de 1/16 ou plus lors de cette nouvelle épreuve, le résultat est considéré comme positif. Pour une séro-surveillance, au niveau du troupeau, effectuée dans le cadre d'enquêtes sérologiques validées statistiquement, c'est le seuil limite de 1/45 qui peut être retenu. Le titre minimum d'anticorps protégeant les animaux vaccinés contre la FA doit être déterminé d'après les résultats du contrôle d'efficacité des vaccins utilisés sur chaque espèce cible.

b) Test ELISA par compétition en phase solide (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Un anti-sérum de lapin spécifique de l'antigène 146S d'un des 7 sérotypes du virus FA est utilisé comme anticorps de capture à une concentration optimale prédéterminée en tampon carbonate/bicarbonate, pH 9,6.

Les antigènes sont préparés par inactivation à l'éthylène-imine de virus répliqués en culture cellulaire selon les procédures décrites pour la production de vaccins. La dilution finale choisie est celle qui, après addition d'un volume égal de diluant, entraîne une absorption dans la partie supérieure de la région linéaire de la courbe de titrage (densité optique d'environ 1,5). Du PBS contenant 0,05 % de Tween 20, 10 % de sérum bovin normal et 5 % de sérum de lapin normal, additionné de rouge de phénol comme indicateur, est utilisé comme diluant (tampon bloquant).

Les anticorps détectants sont des antisérums de cobaye, préparés par inoculation d'antigènes 146S d'un des 7 sérotypes, et prébloqué par un sérum de bovin normal. Des concentrations optimales déterminées au préalable sont préparées dans un tampon bloquant de PBS contenant 0,05 % de Tween 20 et 5 % de lait écrémé en poudre (PBSTL).

Une immunoglobuline de lapin (ou de mouton) anti-cobaye, conjuguée à la peroxydase de raifort et prébloquée avec du sérum normal de bovin est utilisée comme conjugué à une concentration optimale déterminée au préalable en tampon bloquant PBSTL.

Les sérums à tester sont dilués en PBST.

Le test ELISA de compétition en phase solide est plus spécifique tout en étant aussi sensible que le test ELISA de blocage en phase liquide (41, 46). Des méthodes ont été décrites permettant le développement de sous-étalons et de sérums de travail de référence (33) ainsi que de cartes de validation de performance des épreuves (34).

- **Protocole**

- i) La surface intérieure de chacune des puits des plaques ELISA est tapissée de 50 µl de sérum de lapin dirigé contre le virus de la FA, dilué en tampon carbonate/bicarbonate de pH 9,6. Les plaques sont laissées une nuit en chambre humide à 4 °C ;
- ii) Les plaques ELISA sont ensuite lavées trois fois en PBS ;
- iii) Ensuite 50 µl d'antigène du virus de la FA dilué en tampon de blocage est ajouté à chaque puits des plaques ELISA (tampon de blocage : 0,05 % [p/v] Tween 20, 10 % [v/v] sérum normal de bovin, 5 % [v/v] sérum normal de lapin). Les plaques sont couvertes et placées sur un agitateur orbital à 37 °C, en mouvement continu pendant 1 h ;
- iv) Après trois lavages en PBS, 40 µl de tampon de blocage sont ajoutés à chaque puits, additionnés de 10 µl de chaque sérum à tester (ou des sérums témoins), la dilution initiale du sérum étant ainsi de 1/5 ;
- v) Un volume de 50 µl de sérum de cobaye anti-virus de la FA dilué en tampon de blocage est aussitôt ajouté, la dilution finale du sérum devenant alors de 1/10 ;
- vi) Les plaques sont couvertes et incubées sur un agitateur orbital placé à 37 °C pendant 1 h ;
- vii) Après trois lavages en PBS, on ajoute 50 µl d'immunoglobulines anti-cobaye conjuguées (pré-bloquées par incubation 1 h à température ambiante dans un égal volume de sérum de bovin normal) et diluées en tampon de blocage. Les plaques sont couvertes et incubées pendant 1 h à 37 °C sur un agitateur orbital ;
- viii) Après trois lavages en PBS, on ajoute dans chaque puits 50 µl de la solution de substrat, contenant 0,05 % de H₂O₂ additionné d'orthophénylène-diamine ou un autre chromogène adéquat ;
- ix) La réaction est arrêtée après 10 min par addition de 50 µl d'acide sulfurique 1 M. Les plaques sont lues à 492 nm sur un spectrophotomètre relié à un ordinateur ;
- x) *Témoins* : sur chaque plaque, deux puits sont utilisées comme témoin du conjugué (pas de sérum de cobaye), quatre puits pour chacun des sérums fortement et faiblement positifs, deux puits pour les sérums négatifs et quatre puits pour le témoin d'absence de compétition (pas de sérum d'épreuve) ;
- xi) *Interprétation des résultats* : un pourcentage d'inhibition est déterminé pour chaque puits, soit visuellement soit en utilisant un ordinateur et le logiciel approprié, $(100 - [\text{densité optique de chaque épreuve ou valeur du témoin} \div \text{la moyenne de la densité optique des puits avec absence de compétition}] \times 100 \%)$, représentant la compétition entre les sérums à tester et le sérum de cobaye anti-virus de la FA sur la plaque ELISA. Les laboratoires doivent valider l'épreuve en ce qui concerne la valeur limite (« cut-off ») au dessus de laquelle les sérums seront considérés comme donnant une réaction positive, et ce tenant compte (i) des sérotypes et des souches de virus recherchées (ii) du but de l'épreuve et (iii) de la population contrôlée, tout ceci en utilisant les méthodes décrites au Chapitre 1.1.4., « Principes de la validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses ». Au laboratoire de référence OIE de Pirbright, pour le sérotype O dans toutes les espèces et dans le but de démontrer l'absence d'infection dans une population immunologiquement vierge, une inhibition de

60 % est considérée comme une réaction positive (46). Lorsqu'on vise une sensibilité maximale, par exemple lorsqu'il s'agit de certification pour les échanges internationaux, la fourchette de résultats considérés douteux peut se situer entre 40 et 60 %.

c) Test ELISA de blocage en phase liquide (épreuve prescrite pour les échanges internationaux).

Les antigènes sont préparés à partir de souches sélectionnées de virus de la FA répliquées sur un tapis de cellules BHK21. Les surnageants non purifiés sont utilisés et prététrés par dilution sériée de 2 en 2 mais sans sérum. La dilution finale choisie est celle qui, après addition d'un volume égal de diluant (voir plus bas) entraîne une absorption dans la partie supérieure de la région linéaire de la courbe de titrage (densité optique d'environ 1,5). Du PBS contenant 0,05 % de Tween 20 et du rouge de phénol est utilisé comme diluant (PBST). Les autres réactifs utilisés dans l'épreuve sont les mêmes que ceux décrits pour l'ELISA de blocage en phase solide. Un exemple de protocole d'épreuve est décrit ci-dessous. La température et les temps d'incubation peuvent varier en fonction du protocole retenu.

• **Protocole**

- i) La surface intérieure de chacune des puits des plaques ELISA est tapissée de 50 µl de sérum de lapin dirigé contre l'antigène 14S objet de l'épreuve, et les plaques sont laissées une nuit en chambre humide à température ambiante ;
- ii) Les plaques ELISA sont ensuite lavées trois fois en PBS ;
- iii) Dans des plaques à puits en U (plaques porteuses) on dilue chacun des sérums à tester de 2 en 2 sous un volume de 50 µl, en partant de la dilution 1/8. Chaque dilution est réalisée en double. À chaque puits on ajoute 50 µl d'une dose constante d'antigène viral homologue du sérum de lapin utilisé pour sensibiliser la plaque. Le mélange est laissé toute la nuit à 4 °C ou incubé à 37 °C pendant 1 h. L'adjonction de l'antigène porte à 1/16 la dilution finale du sérum ;
- iv) Ensuite 50 µl du mélange sérum/antigène est transféré des plaques porteuses vers les plaques tapissées avec le sérum de lapin, qui sont ensuite incubées à 37 °C pendant 1 h sur un agitateur orbital ;
- v) Après lavage, on ajoute à chaque puits 50 µl d'antisérum de cobaye, homologue de l'antigène viral utilisé dans l'étape précédente (iv) (pré-bloqué avec du sérum normal de bovin et dilué dans du PBST contenant 5 % de lait écrémé en poudre). Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C pendant 1 h sur un agitateur orbital ;
- vi) Les plaques sont lavées, puis on ajoute à chaque puits 50 µl d'immunoglobulines de lapin anti- cobaye conjuguées à la peroxydase de raifort (pré-bloquées avec du sérum normal de bovin et diluées dans du PBST contenant 5 % de lait écrémé en poudre). Les plaques sont incubées à 37 °C pendant 1 h sur un agitateur orbital ;
- vii) Les plaques sont de nouveau lavées trois fois et on ajoute à chaque puits 50 µl de la solution de substrat contenant 0,05 % de H₂O₂ avec de l'orthophénylène-diamine ou un autre chromogène adéquat ;
- viii) La réaction est arrêtée après 15 min par addition de 50 µl d'acide sulfurique 1 M. Les plaques sont lues à 492 nm sur un spectrophotomètre relié à un ordinateur ;
- ix) *Témoins* : chaque plaque comprendra au moins 4 puits de sérums bovins de référence à la dilution finale 1/32 : un sérum fortement positif, un sérum faiblement positif et un sérum négatif, ainsi qu'un nombre équivalent de puits témoins de la réaction antigène (contenant l'antigène dilué mais sans sérum). Pour un titrage au point d'extinction, il faut ajouter une double série de dilutions de raison 2 des sérums homologues bovins de référence positif et négatif dans au moins une plaque par séance de titrage ;
- x) *Interprétation des résultats* : les titres en anticorps sont exprimés au point d'extinction 50 %, qui correspond à la dilution pour laquelle la réaction des sérums à tester donne une densité optique égale à 50 % d'inhibition de la médiane de la densité optique de la réaction (antigène) dans les puits témoins (38). À partir des 4 puits témoins et après élimination du puits ayant la valeur la plus haute et de celle ayant la valeur la plus basse, la médiane est calculée comme la moyenne des valeurs des deux puits restants. On peut aussi utiliser la valeur moyenne après avoir décidé des limites de tolérance pour la variation inter-puits. Un titre inférieur à 1/40 est considéré comme négatif. Pour établir un certificat en vue d'échanges internationaux de bovins on considérera que les titres supérieurs à 1/40 mais inférieurs à 1/90 sont douteux et que d'autres prélèvements doivent être de nouveau analysés. Le résultat de cette seconde épreuve sera considéré comme positif si le titre observé est égal ou supérieur à 1/40. Un seuil de 1/90 semble approprié pour la surveillance des troupeaux dans le cadre d'enquêtes sérologiques statistiquement validées. Le seuil minimum à partir duquel les animaux vaccinés contre la FA sont considérés comme protégés doit être déterminé d'après les résultats du contrôle d'efficacité de chaque vaccin utilisé sur chaque espèce cible.

d) Épreuves pour les anticorps contre les protéines non structurales

Les anticorps dirigés contre des protéines non structurales recombinées du virus FA (par exemple 3A, 3B, 2B, 2C, 3ABC) peuvent être mesurés par différents tests ELISA ou par immuno-empreinte. Ces tests ELISA utilisent soit des antigènes purifiés et adsorbés directement dans les microplaques, soit des anticorps polyclonaux ou monoclonaux pour piéger les antigènes spécifiques de préparations semi-purifiées (14, 20, 42, 59). La méthode de criblage indexée utilisée par Panaftosa est décrite plus loin de façon détaillée. D'autres ELISA indirects ou de compétition détectant les anticorps dirigés contre les protéines 3ABC ont montré les mêmes capacités diagnostiques (17). Les mêmes auteurs confirment les données préliminaires de Panaftosa qui suggéraient que ces capacités étaient équivalentes qu'il s'agisse de bovins, d'ovins ou de porcins.

- **Épreuve immuno-enzymatique indirecte**

- **Préparation des antigènes recombinés (voir ci-dessous le paragraphe suivant consacré à l'épreuve EITB)**

- **Protocole**

- Les puits des microplaques sont tapissées une nuit à 4 °C avec 1 µg/ml d'un antigène 3ABC de fusion en tampon carbonate/bicarbonate, pH 9,6 (100 µl par puits). L'antigène 3ABC a été exprimé et purifié comme indiqué pour l'épreuve EITB (45) ;
- Les plaques sont lavées 6 fois avec du PBS, pH 7,2, additionné de 0,05 % de Tween 20 (PBST) ;
- Les sérums à tester (100 µl par puits) sont ajoutés à une dilution de 1/20 en tampon de blocage constitué de PBS, à 0,05 % de Tween 20, 5 % de lait écrémé en poudre, 10 % de sérum de cheval et de 0,1 % de lysat d'*Escherichia coli*. Chaque plaque comprend une série de témoins sérums négatif, faiblement positif et fortement positif étalonnés par rapport aux sérums internationaux de référence qui sont décrits plus loin ;
- Les plaques sont incubées 30 min à 37 °C et lavées six fois en PBST ;
- Une IgG de lapin anti-espèce conjuguée à la peroxydase de raifort est employée à sa dilution optimale en tampon de blocage, et ajoutée à raison de 100 µl par puits. Les plaques sont incubées pendant 30 min à 37 °C ;
- Après six lavages, chaque puits est rempli avec 100 µl d'une solution de 3'3', 5'5' tétraméthylbenzidine additionnée de 0,004 % (p/v) de H₂O₂ en tampon phosphate/citrate, pH 5,5 ;
- La réaction est arrêtée après 15 min d'incubation à la température du laboratoire par addition de 100 µl de H₂SO₄, 0,5 M. L'absorption est lue à 450 nm et à 620 nm pour la correction du bruit de fond ;
- Interprétation des résultats** : les résultats des épreuves sont exprimés en pourcentages de positivité par rapport au témoin sérum fortement positif [(densité optique du sérum testé ou puits témoin sérique / densité optique du témoin sérique fortement positif) × 100] ou encore comme un index de l'échantillon à tester par rapport au témoin positif (T/C) en se référant à une limite témoin (cut-off, c'est-à-dire seuil de positivité). Le profil des niveaux d'activité des anticorps dirigés contre les PNS dans un troupeau, ainsi que la stratification âge/vaccination, facilitent l'interprétation du statut sanitaire de ce troupeau dans une population vaccinée contre la FA (15). Les valeurs limites de l'épreuve, avec ou sans zone de doute possible, doivent être déterminées en fonction du but de l'épreuve et de la population cible étudiée. Des résultats non concluants peuvent être repris en recourant à des épreuves de confirmation. L'EITB est recommandée pour la surveillance d'animaux vaccinés à de nombreuses reprises. En revanche, s'ils n'ont été vaccinés qu'une ou deux fois, les résultats non concluants sont à confirmer par un second ELISA anti PNS (en sachant que les deux tests peuvent être interdépendants). Il en est de même si l'on souhaite confirmer un résultat positif chez ces animaux. Lorsqu'on prépare un programme de sérosurveillance, il faut tenir compte de la sensibilité et de la spécificité globale de ce système d'épreuve. Bien qu'ils ne soient pas prescrits pour les échanges internationaux, les ELISA anti PNS peuvent constituer un précieux apport lorsque les sérotypes ou les sous-types de virus de la FA de la région d'origine sont inconnus.

- **Épreuve EITB (Enzyme-linked ImmunoelctroTransfer Blot)**

L'épreuve EITB a été largement appliquée en Amérique du Sud comme épreuve de confirmation de la méthode de référence de criblage précédemment décrit. Pour plus d'informations, contacter le Laboratoire de référence de l'OIE, Panaftosa, PAHO/WHO.

- **Préparation des bandes réactives contenant les antigènes recombinés**

- Les cinq protéines non structurales recombinées du virus de la FA 3A, 3B, 2C, 3D and 3ABC sont exprimées dans *Escherichia coli* C600 par thermo-induction. Le polypeptide 3D est exprimé sous forme complète (45), tandis que les autres protéines sont obtenues par fusions en partie N-terminale du gène de la polymérase MS-2 (60) ;

- ii) La polymérase exprimée est purifiée sur phosphocellulose, puis sur colonnes de sépharose poly(U). Les protéines de fusion 3A, 3B, 2C and 3ABC sont purifiées par extraction séquentielle des extraits bactériens en utilisant des concentrations croissantes d'urée. La fraction 7M contenant les protéines de fusion est encore purifiée par électrophorèse sur gel de poly-acrylamide à 10 % (SDS-PAGE, « sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis »). La bande contenant la protéine de fusion est excisée du gel et éluée électriquement (45) ;
- iii) Un mélange contenant 20 ng/ml de chacun des polypeptides recombinés purifiés est séparé sur SDS-PAGE à 12,5 % et transféré par électrophorèse sur un film de nitrocellulose (45).

• **Protocole**

- i) La quantité requise de bandes réactives pour une épreuve EITB doit être prévue en prenant en compte le fait que pour chaque feuille de nitrocellulose (correspondant à un gel de transfert) des témoins sérums fortement positif, faiblement positif, de seuil limite et enfin négatif doivent être nécessaires pour l'épreuve. En général 24 bandes de nitrocellulose, chacune large de 3 mm, doivent être obtenues à partir d'un seul gel ;
- ii) Un volume de 0,8 ml de tampon de saturation (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; 0,2 % de Tween 20 ; 5 % de lait écrémé en poudre et 0,05 % de lysat bactérien d'*E. coli*) est ajouté dans chaque puits. Les bandes recouvertes d'antigènes sont bloquées en les plaçant leurs portoirs sur un agitateur pendant 30 min à la température du laboratoire (20 - 22 °C) ;
- iii) On ajoute aux puits appropriées une dilution au 1/200 des sérums à tester et de chacun des sérums témoins. Les bandes doivent être complètement immergées, côté recto vers le haut, et maintenues dans cette position pendant tout le déroulement de la réaction ;
- iv) Les bandes restent en incubation pendant 60 min sur un agitateur à la température du laboratoire ;
- v) Le liquide est éliminé des portoirs et chaque bande d'épreuve passe trois fois dans une solution de lavage (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; et 0,2 % de Tween 20, 150 mM NaCl) par agitation pendant 5 min ;
- vi) La solution d'anticorps de lapin anti-bovin conjugués à la phosphatase alcaline est ajoutée à chaque puits, et les bandes sont incubées sous agitation pendant 60 min à température du laboratoire ;
- vii) Le liquide est éliminé des portoirs et chaque bande d'épreuve est de nouveau lavée trois fois comme ci-dessus ;
- viii) On ajoute ensuite à chaque puits la solution de substrat (constituée de 0,015 % de bromo-chloro-indolyl-phosphate / 0,03 % de nitrobleu de tétrazolium) qui a été préparée en tampon de substrat (contenant NaCl 100 mM ; MgCl₂ 5 mM ; et du Tris-HCl 100 mM ; pH 9,3) ;
- ix) Les bandes sont incubées en plaçant les portoirs sur un agitateur orbital, et elles restent sous agitation jusqu'à ce que le témoin indiquant les valeurs limite présente cinq bandes bien distinctes et séparées. Les bandes sont alors lavées à l'eau déminéralisée courante et séchées à l'air ;
- x) *Interprétation des résultats* : il est possible de scanner les résultats de l'épreuve EITB avec un densitomètre, mais une lecture visuelle, bien que plus subjective, est considérée comme tout aussi valable. Tous les témoins sérums de référence doivent montrer une coloration stable pour chacun des cinq antigènes. Le résultat de l'analyse d'un prélèvement est considéré comme positif si les antigènes 3ABC, 3A, 3B et 3D ($\pm 2C$) présentent des intensités de coloration égales ou supérieures à celles des témoins correspondant. Le résultat est considéré comme négatif si deux ou plus de ces antigènes montrent des intensités de coloration inférieures à leurs témoins sérums. Les résultats ne correspondent à aucun de ces deux critères doivent être considérés comme ininterprétables.

C. ÉPREUVES POUR CHOISIR UN VACCIN APPROPRIÉ

1. Introduction

La sélection des souches vaccinales a fait l'objet d'une revue récente (48). La vaccination contre l'un des sérotypes de virus de la FA ne protège pas contre les autres sérotypes et peut aussi ne pas protéger complètement contre toutes les souches d'un même sérotype. La méthode la plus directe et la plus fiable permettant de mesurer la protection croisée est de vacciner les espèces cibles et de les éprouver ensuite par un isolat du virus contre lequel on souhaite les protéger. Cette méthode prend en compte à la fois l'activité et le degré de protection croisée du vaccin. Cette approche est tout de même longue et coûteuse, et il vaudrait mieux éviter d'utiliser des animaux pour ces études en recourant à des épreuves alternatives *in vitro* chaque fois que c'est possible.

De nombreuses méthodes sérologiques réalisables *in vitro* peuvent être employées pour quantifier les différences antigéniques entre souches du virus de la FA et estimer ainsi la probabilité de protection croisée entre une souche vaccinale et une souche sauvage. La caractérisation génétique et la détermination du profil antigénique peuvent aussi révéler l'émergence de nouvelles souches auxquelles il faudrait faire correspondre le vaccin et, inversement, peuvent indiquer qu'un isolat est identique à un de ceux contre lesquels existe déjà un vaccin.

La sélection d'une souche vaccinale appropriée constitue un élément important du contrôle de la FA et elle est nécessaire pour lancer un programme de vaccination en régions touchées par la maladie, autant que pour constituer et conserver des réserves d'antigène vaccinal utiles en cas de nouveaux foyers de FA.

L'activité d'un vaccin contribue aussi à accroître la couverture antigénique qu'il peut offrir. Un vaccin dont l'activité a été testée comme grande va stimuler une solide réponse immunitaire. Il pourra ainsi mieux protéger contre un virus hétérologue qu'un vaccin basique qui entraîne une réponse immunitaire plus faible. En outre, les injections de rappel peuvent augmenter l'efficacité d'un vaccin et l'importance de sa couverture antigénique, même si l'installation d'une protection complète peut prendre du temps.

2. Sélection de souches de terrain pour un vaccin approprié

Pour une bonne correspondance sérologique entre souches vaccinales et isolats de terrain, ces derniers doivent être sérotypés et adaptés aux cultures cellulaires. Le sérotype est d'ordinaire déterminé par ELISA ou fixation du complément en utilisant des réactifs sérologiques spécifiques de types, mais on peut aussi recourir à des techniques basées sur les anticorps monoclonaux ou le typage génétique. Le virus est généralement répliqué *in vitro* sur cellules BHK ou IB-RS-2. Pour vérifier la bonne adaptation du vaccin, il faut de préférence étudier au moins deux virus isolés d'un foyer quelconque de FA. Les résultats devront être repris s'ils ne sont pas satisfaisants, pour savoir si cela est dû à des différences antigéniques réelles ou à un artefact d'analyse.

Les virus peuvent être sélectionnés sur la base des données épidémiologiques, obtenues par exemple par l'isolement de virus à différents stades d'une épizootie, dans différentes localisations géographiques et chez différents hôtes (4). Une suspicion d'inefficacité du vaccin observée sur le terrain, qui se traduit par la constatation d'une mauvaise protection contre la maladie, constitue un critère important pour choisir un bon vaccin.

La détermination du profil antigénique par ELISA ou fixation du complément ou l'analyse séquentielle du gène VP1 conviennent bien pour sélectionner les isolats de virus représentatifs qui permettront de choisir le bon vaccin. La détermination du profil antigénique est réalisée par fixation du complément en utilisant des batteries de sérums hyperimmuns de cobaye dirigés contre les isolats sauvages épidémiologiquement significatifs (16), ou par ELISA en utilisant des batteries d'anticorps monoclonaux bien caractérisés (5).

3. Choix des souches de vaccin

La sérotype du virus, sa région d'origine et toute information sur les caractéristiques de l'isolat obtenu sur le terrain peuvent donner des indications sur les souches vaccinales qui lui correspondront probablement le mieux sur le plan antigénique. La possibilité de réaliser les épreuves de sélection de tel ou tel vaccin peut être limitée par manque de réactifs. La caractérisation antigénique a deux objectifs; le premier est de choisir le vaccin le plus efficace à employer dans une circonstance donnée et le second est de suivre, en permanence, la pertinence des souches vaccinales conservées dans les réserves d'antigène stratégiques.

4. Épreuve pour le choix d'un vaccin approprié

Les relations sérologiques entre un virus isolé sur le terrain et un virus vaccinal (valeur « r ») peuvent être déterminées par l'épreuve de la fixation du complément, l'ELISA ou le test de neutralisation virale (40, 49, 55). C'est l'épreuve à sens unique (r_1) qui est recommandée, car elle n'utilise qu'un sérum anti-vaccin, plutôt que l'épreuve à double sens (r_2), nécessitant aussi un sérum dirigé contre l'isolat de terrain auquel doit correspondre ce vaccin. Du fait du de la faible répétabilité inhérente aux épreuves employées, il faut recommencer ces épreuves pour être certain de leurs résultats (56). La neutralisation *in vitro* peut être mieux corrélée à la protection *in vivo* que d'autres méthodes de la réaction virus-anticorps quoique des anticorps non neutralisants puissent être aussi protecteurs (43). L'un des avantages de l'épreuve ELISA est qu'elle est rapide à mettre en œuvre et requiert moins de sérum d'animaux vaccinés, qui n'est souvent disponible qu'en quantité limitée. L'ELISA et fixation du complément sont recommandés comme méthodes de tri des sérums, alors que l'épreuve de neutralisation virale et celle du pourcentage attendu de protection donnent des résultats plus définitifs. Qu'il s'agisse du test de neutralisation virale ou de l'ELISA, les sérums post-vaccinaux doivent provenir de cinq bovins au moins, vaccinés depuis 21 à 30 jours. Le titre en anticorps contre ces vaccins est déterminé pour chacun des sérums. Ces sérums sont utilisés individuellement ou mélangés, après avoir éliminé les animaux mauvais répondeurs immunitaires. La méthode de la fixation du complément emploie des sérums de cobaye dirigés contre les souches vaccinales.

La méthode du pourcentage attendu de protection permet une évaluation plus précise (4). Elle mesure le taux d'anticorps d'une série de sérums provenant d'animaux vaccinés, déterminé à l'aide d'épreuves de neutralisation virale ou d'ELISA, puis elle établit la relation entre les titres ainsi déterminés à la probabilité de protection contre la FA en se référant à des tables de corrélation existantes entre taux d'anticorps et protection contre une souche de virus donnée. Ces tables de corrélation sont basées sur le résultat des épreuves réalisées précédemment sur des animaux vaccinés avec le vaccin à l'étude. Il est toutefois difficile de disposer, pour les nombreuses souches vaccinales existantes, d'une série de sérums d'animaux vaccinés ainsi que des résultats de leur épreuve virulente.

a) Choix du vaccin approprié par ELISA

L'épreuve ELISA emploie un sérum dirigé contre une souche vaccinale. Les titres indiqués par l'ELISA de blocage de ce sérum de référence, dirigé contre les antigènes de la souche vaccinale homologue, sont comparés aux titres correspondants du sérum dirigé contre l'isolat de terrain de façon à déterminer le degré de « similarité » antigénique existante entre cet isolat et la souche vaccinale.

Le protocole d'épreuve est semblable à celui de l'ELISA de blocage en phase liquide (voir paragraphe B.2.c), mais il nécessite quelques réactifs supplémentaires : des sérums de bovins vaccinés depuis 21 à 30 jours (et inactivés 45 à 60 min à 56 °C), la souche vaccinale homologue et un isolat de terrain du même sérotype que celui de la souche vaccinale.

• Protocole

- i) Répliquer l'isolat de terrain et la souche vaccinale sur cellules BHK ou IB-RS-2. Réduire au minimum le nombre de passages sur culture cellulaire (normalement, moins de quatre) pour éviter de sélectionner des variants qui ne seraient pas représentatifs du virus original. La quantité de virus est jugée suffisante lorsqu'un ECP est observé dans les 24 h qui suivent l'inoculation des cellules ;
- ii) Récolter et titrer le virus vaccinal et sauvage à l'aide d'une batterie d'antisérums de capture produits sur lapin et des sérums de détection produits sur cobaye, tous deux dirigés contre les mêmes souches vaccinales ou contre des souches étroitement apparentées. Les antigènes viraux peuvent être inactivés si nécessaire à l'éthylène-imine binaire ;
- iii) Choisir la meilleure combinaison d'anticorps de capture/détection et la dilution de travail du virus sauvage, qui ne doit pas être inférieure à 1/6. Si on ne peut trouver une bonne combinaison de capture/détection, il faut titrer à nouveau le stock d'antigènes pour s'assurer qu'il contient assez de virus. S'il se confirme que le virus sauvage est bien présent à un titre élevé dans ce stock, cela voudra dire qu'aucune des souches vaccinales disponibles ne convient ;
- iv) Titrer un sérum prélevé 21 à 30 jours après vaccination par une souche vaccinale choisie contre l'isolat de terrain et contre la souche vaccinale homologue. Le titre contre la souche vaccinale ne doit pas être inférieur ou supérieur à deux fois le titre moyen du stock de virus en cours ;
- v) Pour déterminer le titre du sérum, calculer la densité optique moyenne (DO) des 24 puits témoins de l'antigène en l'absence de sérum. Cette valeur est celle de la DO maxima pour l'épreuve, c'est-à-dire la valeur témoin 100 %. Diviser cette valeur par 2 pour obtenir la valeur d'inhibition 50 %. Considérer que le résultat de l'épreuve dans les puits contenant le sérum bloquant est positif si la DO est inférieure ou égale à 50 %, et comme négatif si elle est supérieure à 50 %. Le point final est défini comme la dilution à laquelle la moitié des puits présentent au moins 50 % d'inhibition (c'est-à-dire qu'il faut repérer la dilution à laquelle un sur deux des puits dupliqués a une DO inférieure de 50 % à celle du témoin antigène. Si le point final se trouve entre deux dilutions, il est considéré comme le demi-point entre ces dilutions, selon l'estimation donnée par la méthode de Spearman Kärber.

Dériver ainsi la valeur « r », qui est le rapport entre la souche sauvage et la souche vaccinale :

$$r_1 = \frac{\text{réciproque du titre du sérum de référence dirigé contre le virus sauvage}}{\text{réciproque du titre du sérum de référence dirigé contre le virus vaccinal}}$$

Il faut au moins deux résultats cohérents pour valider l'épreuve

- vi) *Interprétation des résultats* : les lignes directrices suivantes seront utilisées pour interpréter les valeurs r_1 obtenues par la technique ELISA (29) :

0,4 – 1,0 : étroite parenté entre souche sauvage et vaccinale. Un vaccin actif fabriqué à partir de cette souche doit protéger.

0,2 – 0,39 : l'isolat de terrain est antigéniquement apparenté à la souche vaccinale. La souche vaccinale peut être utilisable faute de mieux, à condition qu'elle soit incorporée dans un vaccin actif et que les animaux soient de préférence vaccinés plus d'une fois.

< 0,2 : L'isolat de terrain n'est apparenté que de loin à la souche vaccinale et cette dernière a peu de chances de protéger contre une épreuve par l'isolat de terrain.

b) Choix du vaccin approprié par l'épreuve de neutralisation bi-dimensionnelle

Cette épreuve emploie également un sérum dirigé contre une souche vaccinale. On compare les titres de ce sérum capables de neutraliser 100 DICT₅₀ de la souche vaccinale homologe d'une part et 100 DICT₅₀ de l'isolat de terrain d'autre part pour déterminer le degré de « similarité » existant entre le virus sauvage et le virus vaccinal.

Le protocole d'épreuve ressemble à celui de l'épreuve de neutralisation virale sur microplaques (voir paragraphe B.2.a) mais il nécessite quelques réactifs supplémentaires : des sérums de bovins vaccinés depuis 21 à 30 jours (et inactivés 45 à 60 min à 56 °C), la souche vaccinale homologe et un isolat de terrain du même sérotype que celui de la souche vaccinale, qui constituera le virus d'épreuve.

- i) Les isolats de terrain sont répliqués sur cultures cellulaires jusqu'à ce que le virus entraîne un ECP de 100 % en 24 h. Les passages sur culture cellulaire doivent être réduits au minimum. Une fois la souche adaptée, déterminer le point final du titre du virus (log₁₀ DICT₅₀/ml) ;
- ii) Pour chaque épreuve et chaque virus vaccinal, le virus est titré en damier, en présence du sérum dirigé contre le vaccin et avec un témoin sans sérum. Les cellules sont ensuite ajoutées, le tout est incubé à 37 °C pendant 48 à 72 h et on observe l'ECP ;
- iii) Les titres du sérum anti-vaccin contre la souche vaccinale d'une part et la souche sauvage d'autre part sont calculés pour chaque quantité de virus par la méthode de Spearman-Kärber. Le titre du sérum anti-vaccin contre 100 DICT₅₀ de chaque virus peut être estimé par régression. La parenté entre l'isolat de terrain et la souche vaccinale est alors mesurée par la valeur de « r », comme dans le cas précédant par la méthode ELISA ;
- iv) *Interprétation des résultats* : dans le cas de l'épreuve par neutralisation, les valeurs de r_1 supérieures à 0,3 indiquent que l'isolat de terrain est suffisamment proche de la souche vaccinale pour que le vaccin protège probablement contre une épreuve par cet isolat (54). Inversement, des valeurs inférieures à 0,3 laissent à penser que l'isolat de terrain est tellement différent de la souche vaccinale qu'il ne protégera sans doute pas les animaux éprouvés. Dans ce cas, soit il faut titrer l'isolat de terrain vis-à-vis d'une autre souche vaccinale, soit (plus rarement) il faudra fabriquer un nouveau vaccin à partir de la souche sauvage ;
- v) Les épreuves doivent toujours être refaites au moins une fois. La confiance que l'on peut accorder aux valeurs de « r » pour déterminer les différences antigéniques entre souches est fonction du nombre de fois où l'épreuve est répétée. En pratique, il vaut mieux refaire l'épreuve au moins trois fois.

c) Choix du vaccin approprié par l'épreuve de la fixation du complément

La parenté antigénique entre un isolat de terrain et une souche vaccinale peut aussi être établie par la fixation du complément (FC) en utilisant un sérum de cobaye dirigé contre la souche vaccinale en question.

On compare les titres 50 % de ce sérum de référence, déterminés par FC contre des antigènes obtenus à partir de la souche vaccinale homologe et d'un isolat de terrain, pour savoir quel est le degré de « similarité » entre le virus sauvage et le virus vaccinal homologe.

- i) Les isolats de terrain subissent autant de passages qu'il faut en culture cellulaire pour qu'un ECP 100 % soit visible en 24 h. Le nombre de ces passages doit être réduit au minimum. Une fois adapté, on détermine le titre de virus qui fixe 2,5 UFC₅₀ (unités fixant 50 % du complément) ;
- ii) La parenté entre souches est établie en titrant les anti-sérums de cobaye, par double dilution sériée contre 2,5 UFC₅₀, dans des tubes séparés, des antigènes homologues et hétérologues. Le diluant est constitué de tampon véronal (DTV) ou d'une solution saline boratée (SSB). Quatre unités hémolytiques du complément sont ensuite ajoutées à chaque tube ;
- iii) Le matériel d'épreuve est incubé 30 min à 37 °C avant d'y ajouter 2 % de globules rouges de mouton normalisés (GRMS) dilués en DTV ou SSB, préalablement sensibilisés avec du sérum de lapin anti-GRMS. Les réactifs sont incubés encore 30 min à 37 °C, puis les tubes sont centrifugés et lus.
- iv) Les titres 50 % en FC sont calculés par la méthode de Spearman-Kärber, et une valeur « r », est dérivée de la relation existante entre la réactivité de l'isolat de terrain et la souche vaccinale en utilisant la formule suivante :

$$r_1 = \frac{\text{réciproque du titre du sérum de référence dirigé contre le virus sauvage}}{\text{réciproque du titre du sérum de référence dirigé contre le virus vaccinal}}$$

- iv) *Interprétation des résultats* : dans le cas de l'épreuve par FC, les valeurs de r_1 supérieures à 0,25 indiquent que l'isolat de terrain est suffisamment proche de la souche vaccinale et que le vaccin protégera probablement contre une épreuve par cet isolat (3).

d) Pourcentage attendu de protection

Le pourcentage attendu de protection (PAP) estime la probabilité qu'un bovin soit protégé contre une épreuve par 10 000 doses infectieuses après une vaccination avec ou sans rappel.

- i) Le sérum de 16 à 30 bovins âgés de 18 à 24 mois est prélevé 30 jours après vaccination et 30 jours après re-vaccination avec une dose complète de la souche vaccinale à étudier.
- ii) Les anticorps dirigés contre la souche homologue de vaccin de la FA et l'isolat de terrain à étudier sont titrés dans cette collection de sérums, par la méthode de neutralisation virale ou par l'ELISA de blocage en phase liquide (voir sections B.2.a et B.2.c).
- iii) Si nécessaire, les antigènes utilisés dans l'épreuve ELISA peuvent être inactivés par l'éthylène-imine binaire.
- iv) Le PAP est déduit du titre de chacun des sérums, en se référant pour ce faire à une table pré-existante de corrélation entre le titre d'anticorps du virus de la FA et la protection contre cette maladie. Le PAP moyen est alors calculé à partir du PAP de chacun des sérums.
- v) Les données concernant la protection contre la maladie sont déduites d'expériences précédentes sur des centaines de bovins immunisés avec la souche vaccinale puis éprouvés avec le virus sauvage homologue (un peu comme les épreuves d'activité PGP décrites au paragraphe D.4.b). Chaque animal est classé « protégé » ou « non protégé », et des tables de corrélation basés sur des modèles de régression statistique sont établis entre titres d'anticorps et protection contre la maladie.
- vi) Un PAP < 75 % (lorsqu'on utilise les sérums de 16 animaux revaccinés) et < 70 % (lorsqu'on utilise les sérums de 30 animaux revaccinés) indique que le vaccin protégera mal contre la souche de terrain (47).

D. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Le contrôle de la FA est habituellement une responsabilité nationale et, dans beaucoup de pays, le vaccin ne peut être utilisé que sous le contrôle de l'autorité compétente.

Des lignes directrices pour la production des vaccins vétérinaires sont données au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ici et dans le Chapitre 1.1.8. restent de nature générale et peuvent être complétées par des exigences nationales ou régionales. Chaque pays ou région peut avoir des exigences différentes vis-à-vis des producteurs concernant la qualité, l'innocuité et l'efficacité de vaccins à usage vétérinaire pour lesquels ils sollicitent un permis ou une autorisation de mise sur le marché. Dans la mesure du possible, les producteurs doivent obtenir ces permis ou autorisations de mise sur le marché de la part d'établissements de vérification indépendants en ce qui concerne la qualité de leurs produits.

Étant donné que pour la production des vaccins contre la FA, il faut utiliser du virus virulent, les établissements de production doivent opérer en conséquence en respectant notamment les règles et pratiques de biosécurité appropriées. En particulier les établissements doivent répondre aux exigences pour le confinement des agents pathogènes du groupe 4 comme cela est exposé au Chapitre 1.1.2. de ce *Manuel terrestre*.

La vaccination de routine contre la FA est utilisée dans beaucoup de pays ou dans des zones reconnues comme libre de FA avec vaccination ou alors là où la FA est enzootique. À l'opposé un certain nombre de pays indemnes de FA n'ont jamais vacciné leurs animaux en préférant utiliser le strict contrôle des déplacements d'animaux et, en cas de foyer, l'abattage des animaux infectés et en contact. Néanmoins, beaucoup de pays libres de FA se réservent la possibilité de vacciner et possèdent donc leur propre réserve stratégique de préparations hautement concentrées de virus inactivé de la FA. En cas d'urgence, ces réserves d'antigènes permettent de délivrer sans délai des vaccins prêts à l'emploi (26).

Les vaccins de la FA peuvent être définis comme des formulations fixes contenant des quantités définies (limites) d'une ou plusieurs préparation(s) de virus de semence répliqué sur cellules, inactivées par un produit chimique et mélangées à des adjuvants ou excipients appropriés. Les vaccins sont formulés en fonction de l'espèce cible, et contiennent de préférence des adjuvants huileux s'ils sont destinés aux porcs. Ces vaccins à adjuvants huileux peuvent également être employés chez les ruminants, en présentant l'avantage de moins interférer avec les anticorps maternels et de d'induire une plus longue immunité. Les vaccins de la FA peuvent être classés en vaccins d'activité « standard » ou d'activité « supérieure ». Les vaccins d'activité « standard » sont formulés de façon à contenir une quantité d'antigène suffisante pour leur permettre d'atteindre le niveau minimum d'activité exigé (recommandé au paragraphe D.4.b comme étant de 3 DP₅₀ [dose protectrice 50 %]). Les vaccins d'activité « supérieure » contiennent plus d'antigène, de façon à ce que leur activité dépasse le minimum requis et qu'ils permettent l'installation d'une immunité plus rapide et plus large vis-à-vis des virus sauvages reconnus sur le

terrain. Ces vaccins sont donc bien adaptés aux interventions d'urgence. Les vaccins à virus non inactivé de la FA ne peuvent être acceptés du fait du danger de réversion à la virulence qu'ils présentent et parce qu'ils ne permettent pas distinguer les animaux infectés des animaux vaccinés.

En raison de la présence de nombreux sérotypes de virus, beaucoup de vaccins de la FA sont multivalents et contiennent généralement deux ou plusieurs sérotypes. Dans certaines régions, il est nécessaire d'introduire plus d'une souche vaccinale par sérotype pour assurer une large couverture antigénique contre les virus présents sur le terrain.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Dans l'idéal, la sélection d'une semence virale primaire (MSV) doit se faire en fonction la facilité qu'ont ces virus à se répliquer en culture de cellules, du rendement de cette répllication ainsi que de la stabilité et de l'étendue du spectre antigénique (57). Les MSV doivent être caractérisées et distribuées par les laboratoires officiels de contrôles, dans les pays où il existe de tels laboratoires ; elles doivent être sélectionnées en fonction de l'importance épidémiologique de chaque variant viral.

b) Méthode de culture

Quand il n'existe pas déjà de souche vaccinale appropriée, les nouvelles souches vaccinales dérivent d'une MSV obtenue à partir d'un virus sauvage local adapté par passage en série sur cultures cellulaires en monocouche ou en suspension. Pour écarter tout risque d'une éventuelle contamination de la VSM candidate par des virus à enveloppe lipidique, il est recommandé de lui faire subir un traitement avec un solvant organique avant ou pendant son adaptation à la culture cellulaire. Il vaut mieux limiter au minimum le nombre de passages en culture cellulaire, puisqu'il a été démontré que ces passages pouvaient entraîner des variations antigéniques.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Les VSM doivent être caractérisés antigéniquement et reconnus purs et exempts de tous agents de contamination étrangers figurant sur une liste dressée par les autorités d'enregistrement compétentes. Il faut ensuite établir leur homologie avec les isolats candidats originaux et leur efficacité vis-à-vis des virus circulant sur le terrain, dont ils dérivent. Ceci suppose souvent le recours à plusieurs méthodes parmi lesquelles les plus fiables sont les épreuves de protection croisée *in vivo*. Sinon des épreuves *in vitro* (de préférence la neutralisation du virus) peuvent être utilisées, à condition de disposer de sérums d'animaux vaccinés avec ces semences primaires. Les semences virales peuvent être conservées à -20°C avec de la glycérine ou à plus basse température sans glycérine, par exemple à -70°C . Les semences virales de travail peuvent être multipliées par un ou plusieurs passages à partir du stock de semence primaire et servir à inoculer la culture cellulaire finale de virus à un taux d'environ 1 PFU (plaque forming unit / unité formant plaques) pour 100 cellules. L'origine exacte l'isolat doit être notée autant que faire se peut, en donnant des détails tels que le lieu de l'isolement ainsi que l'espèce animale et le type de matériel d'où provient le virus. L'histoire des passages *in vitro* du virus doit être enregistrée. Il faut aussi veiller à réduire au minimum le risque de transmission d'agents d'encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) en vérifiant qu'il n'y a pas de matériel à risques lié au virus ou à aucun des milieux utilisés dans sa propagation.

2. Méthode de fabrication

Il est recommandé de réaliser la propagation du virus de la FA destiné à la production d'antigène de manière stérile et de préférence dans des cultures en suspension dans un fermenteur industriel, ou sur des tapis cellulaires de lignées continues. Les cultures de cellules primaires peuvent être acceptables pour la production de vaccin dans certains pays à condition d'être obtenues par une méthode qui suive parfaitement les Bonnes Pratiques de Fabrication. L'inactivation des tous contaminants étrangers possibles doit être assurée selon une procédure validée et des épreuves appropriées doivent être appliquées en cours de fabrication et sur le produit final pour s'assurer de la conformité et de l'innocuité de ce produit. Il est essentiel que toute la tuyauterie et tous les récipients soient stérilisés avec soin pour qu'aucun point du système de production ne contienne de microorganismes. Outre les considérations générales sur la stérilité, il est important de noter que le virus est vulnérable aux attaques des enzymes protéolytiques, comme celles produites par les microorganismes (22). Le contrôle du pH et de la température sont aussi des points critiques du fait de la fragilité du virus vis-à-vis des acides et de la température (21). La température optimale de croissance des cellules et du virus qui est d'environ 37°C , et celle de l'inactivation qui est de 26°C , doivent être rigoureusement contrôlées. Pendant les autres étapes de la production, la température doit être réduite à 4 ou 6°C . Le virus doit être maintenu à pH 7,6 environ, et jamais à un pH inférieur à 7.

Une souche adéquate de virus est utilisée pour inoculer une lignée cellulaire en monocouche ou en suspension, par exemple de cellules BHK-21. De telles cultures de cellules doivent être reconnues exemptes de microorganismes contaminants. Une pratique courante consiste à garder les stocks de cellules BHK congelés dans de l'azote liquide et de les remettre en culture à la demande. Au cours de cette opération, les cellules sont multipliées dans un milieu nutritif jusqu'à un volume et une densité cellulaire appropriés pour ensemençer la culture principale. Cette dernière est ensemençée de façon à obtenir une densité initiale d'environ $0,2$ à $0,5 \times 10^6$ cellules/ml, qui peut atteindre jusqu'à 2 à 5×10^6 cellules/ml avant d'être infectée avec le virus.

Quand le virus a atteint son titre maximal, qui peut être déterminé par l'infectivité du virus ou par la fixation du complément ou par tout autre méthode, la culture est clarifiée, souvent à l'aide d'un traitement par le chloroforme, suivi d'une centrifugation et d'une filtration. Par la suite le virus traité est inactivé par addition d'éthylène-imine (EI), généralement sous la forme d'éthylène-imine binaire (EIB). Cette préparation est habituellement réalisée par la dissolution de 2-bromo-éthylamine hydrobromide $0,1$ M dans de la soude (hydroxyde de sodium) à $0,2$ N, le tout incubé à 37 °C pendant 1 h (9, 10). L'EIB ainsi formée est alors ajoutée à la suspension virale maintenue à 26 °C jusqu'à atteindre la concentration finale de 3 mM. L'inactivation se prolonge en général pendant 24 h, suivie par une seconde dose d'EIB pendant encore 24 h. La durée du traitement par l'EIB ainsi que la température utilisée pour l'inactivation doivent être validées en fonction des conditions du laboratoire et pour les équipements utilisés. Après l'inactivation toute trace résiduelle d'EIB dans le produit peut être neutralisée par addition de thiosulfate de sodium jusqu'à une concentration finale de 2 %. Pour augmenter la probabilité de contact entre le virus et l'EIB lors de la seconde application, il est essentiel d'effectuer un transfert du contenu du récipient dans un second récipient stérile où l'inactivation peut s'achever en 48 h.

Le virus inactivé peut être concentré par ultrafiltration, précipitation par le polyéthylène glycol ou adsorption avec de l'oxyde de polyéthylène (1, 62). Les virus concentrés inactivés peuvent être encore mieux purifiés par des procédés comme la chromatographie. Ces antigènes concentrés peuvent être conservés à -70 °C ou à des températures plus basses pendant de nombreuses années si nécessaire, et transformés en vaccin à la demande par dilution dans un tampon adéquat et addition d'adjuvants de l'immunité (24).

Les vaccins traditionnels de la FA sont formulés avec des adjuvants soit aqueux soit huileux. Le vaccin aqueux, qui est le plus communément utilisé pour les bovins est préparé par adsorption du virus sur gel d'hydroxyde d'alumine, un des adjuvants constituant du produit final. Les autres composants du produit final comprennent de l'anti-mousse, du rouge de phénol (si cela est permis par le pays utilisateur du vaccin), de l'hydrolysate de lactalbumine, du bouillon tryptose phosphate, des acides aminés, des vitamines et les sels des tampons. Un second adjuvant, la saponine dérivée d'un arbre d'Amérique du Sud *Quillaja saponaria mollina*, est aussi incorporé ainsi que du merthiolate ou du chloroforme comme agents conservateurs.

La formule des vaccins à adjuvants huileux comprend généralement des huiles minérales comme le Marcol ou le Drakeol. Ces préparations offrent plusieurs avantages par rapport au vaccin standard à l'hydroxyde d'alumine/saponine, l'un des plus importants étant leur efficacité chez les porcs. Elles sont largement utilisées pour vacciner les bovins en Amérique du Sud du fait d'une plus longue durée d'immunité. L'huile minérale est d'habitude pré-mélangée avec un agent émulsifiant comme le mono-oléate de mannide avant l'addition d'une certaine proportion ou de la totalité de la phase aqueuse du vaccin. Le tout est émulsionné par une turbine colloïdale ou dans un appareil à flux continu d'ultrasons. Plus complexes sont les émulsions doubles (par ex : eau dans l'huile dans l'eau) qui peuvent être produites par une nouvelle émulsion dans une phase aqueuse contenant une petite quantité de détergent comme le Tween 80 (37).

Une alternative est l'utilisation d'adjuvants huileux « prêts à l'emploi ». Les huiles contenant des esters d'acide octadécénoïque et de 2,5 anhydro-d-mannitol par exemple, forment aisément des émulsions doubles (eau dans l'huile dans l'eau) ou mixtes qui sont à la fois stables et de faible viscosité sans nécessiter l'utilisation d'équipement compliqués pour émulsions (11, 26). Lorsqu'on utilise de nouveaux composants, y compris des adjuvants, et quelque soit le vaccin, il est important de savoir quel est leur statut en matière de résidus dans les produits animaux issus d'espèces de rente. Ce statut doit être connu, afin que les autorités responsables des mises sur la marché soient en mesure de pouvoir garantir la sécurité des consommateurs. Cette exigence limite considérablement le choix des adjuvants utilisables chez les animaux de production.

3. Contrôles en cours de fabrication

En général, les titres de virus atteignent leur optimum en 24 h après infection de la culture cellulaire. Le moment choisi pour la récolte peut se baser sur différents critères, par exemple la mort des cellules. Les concentrations virales peuvent être évaluées par un test d'infectivité, des méthodes comme l'analyse sur gradient de densité en sucrose (23), ou des méthodes sérologiques. Il vaut mieux utiliser une méthode qui mesure la masse antigénique, comme l'analyse par gradient de densité en sucrose, associée à une autre qui mesure l'infectivité virale, puisque les deux propriétés ne coïncident pas nécessairement et que chaque méthode peut compléter l'autre.

Pendant l'inactivation du virus, des prélèvements à intervalles réguliers doivent être faits dans le but de suivre le rythme et la linéarité du processus d'inactivation. Les titres du virus dans chaque prélèvement sont déterminés par inoculation de cultures de cellules reconnues comme très sensibles au virus de la FA, cellules BHK-21 ou cellules de thyroïde de bovin. Ces cultures permettent d'analyser des prélèvements statistiquement significatifs dans des conditions reproductibles. Les \log_{10} d'infectivité des prélèvements réguliers sont reportés sur un graphique en fonction du temps, et le processus d'inactivation n'est pas considéré comme satisfaisant tant qu'au moins la partie la plus distale de la courbe n'est pas linéaire, et que l'extrapolation de cette courbe indique qu'il reste moins de une particule infectieuse pour 10^4 litres d'antigène à la fin de la période d'inactivation.

4. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Les contrôles d'innocuité (ou de non-infectivité) seront plus efficaces s'ils sont effectués sur la totalité de la récolte de virus, concentrée et inactivée (voir les sections D.3 et D.5.b ci-dessous). Bien que l'on puisse confirmer l'innocuité en testant le virus élué du vaccin, ce n'est pas universellement applicable à toutes les formulations et n'est pas aussi sûr que les tests réalisés sur les antigènes concentrés. C'est ainsi que la saponine influence grandement l'élution du virus de la FA des vaccins à l'hydroxyde d'alumine/saponine (25). Lorsqu'une procédure d'élution s'avère appropriée à une formulation donnée, elle peut être validée en ensemençant un échantillon de vaccin témoin avec un peu de virus non inactivé (12).

Pour être accepté par les autorités de contrôle, l'absence de toxicité locale et générale d'un lot de vaccin d'essai doit être vérifiée au cours d'un test *in vivo* effectué avec un nombre approprié de bovins auxquels la vaccin aura été administré par les différentes voies recommandées (27). Des contrôles avec doses doubles et des doses répétées de vaccins formulés pour contenir le nombre et les quantités maximales permises d'antigènes seront effectués selon un protocole similaire à celui décrit plus loin pour le contrôle d'innocuité des lots de vaccin.

b) Activité

Des bovins utilisés seront âgés d'au moins 6 mois, en provenance de régions indemnes de FA, n'ayant jamais été vaccinés contre cette maladie et reconnus dépourvus d'anticorps dirigés contre les différents types de virus de la FA. Trois groupes, comprenant au moins cinq bovins chacun, doivent être vaccinés par la voie recommandée par le fabricant. Le vaccin doit être administré à différentes doses selon les groupes par injection de différents volumes du vaccin. Par exemple : si l'étiquette précise que l'injection de 2 ml correspond à l'administration d'une dose de vaccin, 1/4 de dose de vaccin sera obtenu en injectant 0,5 ml, et le 1/10 de dose par injection de 0,2 ml. Ces animaux ainsi que deux animaux témoins non vaccinés seront éprouvés soit 3 semaines (vaccins aqueux) soit 4 semaines au moins (vaccin huileux) après la vaccination, en utilisant une suspension de virus bovin pleinement virulent et correspondant au type de virus présent dans le vaccin qui fait l'objet du contrôle. La suspension virale doit contenir l'équivalent de 10 000 DI_{50} (doses infectieuses 50 %) sous un volume de 0,2 ml injectés par voie intradermique en deux points de la surface dorsale de la langue (0,1 ml par point). Les animaux sont observés pendant 8 jours au moins. Ceux qui ne sont pas protégés présentent des lésions ailleurs que sur la langue. Les animaux témoins doivent présenter des lésions sur au moins trois pieds. La dose protectrice 50 % (DP_{50}) contenue dans le vaccin est calculée à partir du nombre d'animaux protégés dans chaque groupe. Il existe différentes méthodes de calcul de la DP_{50} (31), mais, en général, on préfère les calculs basés sur la méthode de Spearman Kärber (38). Le vaccin doit contenir au moins 3 DP_{50} par dose pour bovin quand il est employé pour des opérations prophylactiques de routine, bien que 6 DP_{50} par dose soit généralement préférables. Certains vaccins de forte activité peuvent prévenir le développement de lésions locales sur la langue au point d'injection du virus.

Pour l'épreuve de protection contre la généralisation de l'infection podale (PGP) un groupe de 16 bovins âgés d'au moins 6 mois et exempts d'anticorps de la FA, présentant les mêmes caractéristiques que celles décrites plus haut pour l'épreuve de la DP_{50} , reçoivent une dose complète de vaccin administrée par la voie recommandée par le fabricant. Ces animaux ainsi que deux témoins non vaccinés sont éprouvés 4 semaines ou plus après vaccination avec une souche d'épreuve qui est une suspension de virus bovin pleinement virulent correspondant au type de virus contenu dans le vaccin testé. L'inoculation intradermique d'un total de 10 000 DIB_{50} (dose moyenne infectante [50 %] pour les bovins), est pratiquée en au moins deux points de la face dorsale de la langue. Les animaux non protégés présentent des lésions ailleurs que sur la langue dans les 7 jours suivant l'inoculation. Les animaux témoins doivent développer des lésions sur au moins trois pieds. Pour les vaccins utilisés en prophylaxie de routine, au moins 12 animaux sur 16 vaccinés doivent être protégés. Les animaux sont observés de 7 à 8 jours après l'épreuve (61).

Les contrôles d'activité chez les autres espèces-cibles comme les ovins, les caprins ou les buffles d'Asie sont soit différents soit non encore normalisés. Un contrôle satisfaisant sur bovins est généralement

considéré comme une garantie suffisante de qualité du vaccin pour qu'il soit utilisable chez d'autres espèces. Lorsqu'un vaccin est produit surtout pour une espèce autre que l'espèce bovine, il vaudrait mieux en contrôler l'activité chez cette même espèce. En ce qui concerne le buffle Africain (*Syncerus caffer*) ou le buffle d'Asie (*Bubalus bubalis*) et les moutons, et compte tenu du caractère souvent asymptomatique de la maladie chez ces espèces, les résultats des épreuves d'activité des vaccins chez les bovins peuvent apporter une meilleure indication que ceux d'une épreuve réalisée chez d'autres espèces, mais qui dépendrait de la détection des signes cliniques de la maladie.

Un protocole correspondant à celui de l'épreuve utilisée chez les bovins peut être adopté pour mesurer l'activité des vaccins destinés aux porcins en employant trois groupes de cinq porcs, âgés d'au moins deux mois et exempts d'anticorps neutralisant les différents sérotypes du virus de la FA. Les animaux d'un premier groupe sont vaccinés avec la dose complète recommandée pour les porcins par le fabricant, ceux du deuxième reçoivent une dose réduite, par exemple $\frac{1}{4}$ de dose et ceux du troisième reçoivent une dose encore plus faible, par exemple $\frac{1}{16}$ de dose. Il est admis que la réponse immunitaire aux vaccins additionnés d'un adjuvant huileux est plus longue à se mettre en place, et ce n'est donc que 28 jours après leur vaccination que seront éprouvés les animaux des trois groupes ainsi que deux témoins non vaccinés. Toutefois, en fonction de la formulation du vaccin, ce délai peut être réduit par rapport à celui utilisé chez les bovins. Il est important que les différents groupes soient séparés les uns des autres pendant toute la durée de l'épreuve et que, dès que des animaux présentant des signes de FA généralisée, ils soient retirés pour éviter que ceux qui restent ne subissent ainsi une épreuve virulente supplémentaire. L'épreuve sera réalisée par inoculation intradermique du virus dans les coussinets plantaires de l'un des pieds du porc. La quantité de virus sera de 10 000 DICT₅₀ (0,2 ml), mesurée sur des cellules adaptées au porc. On emploiera une souche de virus d'épreuve homologue de celle du vaccin et déclenchant normalement une FA généralisée chez le porc. Le virus d'épreuve peut aussi être administré en un point des muscles du cou situé derrière l'oreille, à une dose telle qu'elle entraîne une FA généralisée par cette voie d'inoculation. Les animaux sont surveillés quotidiennement pendant 10 jours, pour observer tout symptôme éventuel de FA. Les deux animaux témoins doivent présenter des lésions de FA au niveau de l'un des pieds au moins. Le nombre de DP₅₀ contenues dans le vaccin est déterminé d'après le nombre d'animaux qui ont été protégés dans chacun des groupes. Il existe différentes méthodes de calcul de la DP₅₀ (31), notamment la méthode de Spearman Kärber. Chaque dose de vaccin pour porcs doit contenir au moins 3 DP₅₀. Un protocole d'épreuve identique au protocole PGP utilisé chez les bovins a été adopté pour les porcins, avec un groupe de 16 animaux recevant une dose complète de vaccin et deux témoins non vaccinés. L'épreuve sera réalisée par inoculation intradermique 10 000 DICT₅₀ (0,2 ml) de virus dans les coussinets plantaires de l'un des pieds du porc. On emploiera une souche de virus d'épreuve homologue de celle du vaccin et connue pour entraîner une FA cliniquement décelable chez le porc.

Des contrôles indirects incluant le titrage en cultures cellulaires des anticorps post-vaccination neutralisant le virus, ou le titrage des anticorps par ELISA, ou le titrage des anticorps séro-protecteurs chez les sourceaux nouveau-nés peuvent être utilisés pour évaluer l'activité d'un vaccin, à condition qu'une étude statistique ait établi une corrélation satisfaisante entre les résultats obtenus par le contrôle du sérotype vaccinal en question et le contrôle d'activité sur bovins (60). Par exemple, l'épreuve du pourcentage escompté de protection (PEP) est utilisé pour analyser les sérums d'un groupe d'au moins 16 bovins vaccinés et pour exprimer la probabilité qu'un animal d'être protégé par la seule mesure de ses anticorps neutralisants, ou protecteurs, ou déterminés par ELISA. Dans un groupe d'animaux ayant reçu une dose complète de vaccin, la moyenne individuelle de PEP doit être égale ou supérieure à 75 % quand 16 animaux sont utilisés ou à 70 % quand 30 animaux sont utilisés dans le groupe expérimental.

La présence d'un ou plusieurs sérotypes dans un même vaccin ne diminue pas la production des anticorps contre un d'autres sérotypes, et ne modifie pas la corrélation existante entre titres d'anticorps et protection contre la FA.

c) Contrôle de la pureté du vaccin : protéines virales non-structurales

Le *Code sanitaire pour les animaux terrestres* de l'OIE stipule que, pour qu'un pays retrouve son statut indemne de FA suite à l'apparition d'un foyer de la maladie, et si les animaux étaient vaccinés dans ce pays, l'une des exigences est de rechercher les anticorps anti-protéines virales non-structurales (PNS) chez ces animaux. De même, les pays désirant être reconnus indemnes de FA avec vaccination ont l'obligation de démontrer l'absence de virus FA circulant en apportant la démonstration que les animaux vaccinés sont exempts d'anticorps contre les PNS virales résultant d'une infection virale. En conséquence, les antigènes du virus de la FA utilisés dans les vaccins employés dans ces circonstances doivent être purifiés pour réduire leur contenu en PNS virales.

Les techniques actuelles de production permettent d'éliminer la majorité des PNS du virus vaccinal, ce qui réduit voire supprime la production d'anticorps dirigés contre ces PNS. Dans ces conditions, la découverte d'anticorps anti-PNS peut apporter la preuve que les animaux vaccinés ont été exposés à un virus non inactivé de la FA. Les producteurs de vaccins peuvent profiter de l'occasion ainsi offerte de se prévaloir du fait que leurs vaccins n'induisent pas d'anticorps contre une ou plusieurs PNS et peuvent donc être utilisés

en association avec une épreuve diagnostique appropriée. Dans ce but, les fabricants de vaccins devront non seulement fournir la documentation pertinente concernant le procédé employé pour parvenir à une telle purification, mais également démontrer le manque de pouvoir immunogène des protéines virales NS de leur vaccin dans le dossier d'enregistrement, de manière à pouvoir s'en prévaloir sur l'étiquette du produit.

Une méthode de contrôle qui peut être utilisée consiste en la vaccination d'un nombre approprié de veaux, de préférence à l'aide d'une double dose au moins d'un mélange expérimental de vaccin contenant le nombre maximal et la quantité maximale d'antigènes permis par l'autorisation de mise sur le marché (ces veaux peuvent être les mêmes que ceux utilisés pour les contrôles d'innocuité décrits au paragraphe D.4 de ce Chapitre). Les veaux devront être vaccinés au moins trois fois au cours d'une période de 3 à 6 mois et les anticorps anti-PNS seront recherchés chez eux 30 à 60 jours après la dernière vaccination, avec les méthodes décrites au paragraphe B.2.d. de ce Chapitre. Si ces recherches sont négatives, le vaccin pourra être considéré comme n'induisant pas d'anticorps contre les PNS.

Au niveau du lot de vaccin, la confirmation de la pureté du vaccin peut être apportée par la démonstration d'une absence d'augmentation de la réponse sérologique vis-à-vis des PNS virales chez les animaux utilisés dans le contrôle d'activité. Il faut utiliser des sérums obtenus chez ces animaux 30 jours après leur primo-vaccination et avant leur épreuve, et comparer les résultats de leur analyse à ceux de sérums provenant des mêmes animaux mais collectés avant vaccination.

d) Durée de l'immunité

Pour obtenir un niveau satisfaisant d'immunité, le protocole vaccinal prévoit généralement une primo-vaccination comportant deux injections à 2 à 4 semaines d'intervalle, suivies d'un rappel tous les 4 à 12 mois. La fréquence des revaccinations dépendra de la situation épidémiologique et du type et de la qualité des vaccins employés. Dans les régions où les animaux sont difficiles à atteindre, il est préférable d'employer des vaccins à adjuvants huileux à l'âge de 4 à 12 mois, puis de revacciner chaque année.

Pour les veaux nés de mères vaccinées, la première vaccination doit être retardée aussi longtemps que possible pour permettre la disparition progressive des anticorps maternels, mais pas au-delà de 4 mois car à cet âge de nombreux sujets peuvent répondre effectivement à la vaccination. Pour les veaux nés de mères non vaccinées, la première vaccination peut être pratiquée dès la première semaine d'âge (8).

e) Stabilité

La durée de péremption des vaccins conventionnels contre la FA est habituellement de 1 à 2 ans à 4 °C (Intervalle maximal 2 à 8 °C), mais ils sont sensibles à la température et ne doivent jamais être congelés ni stockés au-dessus de 4 °C. La stabilité de tous les vaccins, mais notamment de ceux qui sont en émulsion huileuse, doit être aussi démontrée dans la partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché qui concerne la limite de validité du vaccin.

f) Agents de conservation

Les agents de conservation les plus employés sont le chloroforme et le merthiolate. Ce dernier est utilisé à la concentration de 1/30 000 (p/v).

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Les vaccins contre la FA actuels sont inoffensifs et ne présentent pas de risque toxique pour l'utilisateur. Néanmoins il faudra prendre garde aux auto-injections possibles de vaccins en émulsion huileuse.

5. Contrôles des lots

a) Stérilité

L'antigène inactivé en vrac, les adjuvants, les tampons de dilution et le produit final formulé doivent tous subir des contrôles de stérilité. Ceci peut ne concerner directement que les composants du vaccin et le produit final, mais la méthode préférée consiste à retenir tous les micro-organismes contaminants en filtrant le matériel examiné sur une membrane puis à rechercher les micro-organismes retenus sur ces filtres en les incubant dans un milieu de culture. Ce dernier procédé permet l'élimination des conservateurs, etc. qui peuvent gêner la détection des micro-organismes. Des lignes directrices sur ces techniques et sur les milieux de culture qui permettent la détection d'une grande variété d'organismes sont décrites dans la Pharmacopée Européenne 2008 (27 ; se référer aussi au Chapitre I.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »).

b) Innocuité

L'épreuve d'innocuité doit être effectuée en cours de production sur chaque lot d'antigène. Après l'inactivation, l'absence de virus infectieux doit être vérifiée sur un prélèvement effectué dans chaque lot d'antigène représentant au moins 200 doses. Cette vérification est assurée par inoculation d'un tapis de cellules sensibles, de préférence de la même origine que celle des cellules utilisées pour la production du virus. Il peut être préférable de concentrer l'antigène pour cette épreuve, mais dans ce cas il faudra démontrer que le matériel concentré n'interfère pas avec la sensibilité ou avec la lecture du test. Les tapis cellulaires sont examinés quotidiennement pendant trois jours, après quoi le milieu surnageant épuisé est transféré sur un nouveau tapis cellulaire, et le milieu de culture du tapis précédent est changé. En utilisant cette méthode, les traces de virus non inactivé peuvent être amplifiées par ces passages et détectées grâce à l'ECP observé. Habituellement, deux à trois passages de la préparation virale originale sont réalisés. Une variante de cette méthode consiste à congeler/décongeler les premiers tapis cellulaires pour en libérer le virus intra-cellulaire, qui pourra être détecté à l'occasion des passages suivants.

c) Sécurité

L'épreuve de sécurité sur le produit final a pour but de détecter toute réaction locale ou systémique indésirable. Elle peut également confirmer l'innocuité du produit, mais elle n'est pas aussi sensible que les épreuves *in vitro* précédemment décrites. Pour qu'un lot de vaccin puisse être libéré, au moins deux bovins en bonne santé et reconnus exempts d'anticorps spécifiques reçoivent chacun une dose de vaccin double celle recommandée par le fabricant, administrée par la voie recommandée. Les animaux sont observés pendant 14 jours au moins pour détecter toute réaction locale ou systémique éventuelle après cette vaccination. Si un seul des animaux présente des symptômes de FA, le lot de vaccin n'est pas libéré. Toute toxicité anormale éventuellement liée à l'injection vaccinale doit également être recherchée, et sa constatation peut entraîner le refus du lot de vaccin incriminé. L'idéal serait que la sécurité des vaccins destinés à d'autres espèces que les bovins soit vérifiée sur l'espèce-cible, en leur injectant une dose de vaccin double de celle recommandée par le fabricant, administrée par la voie recommandée. Les animaux devront être observés quotidiennement pendant 14 jours au moins pour détecter toute toxicité éventuelle ou symptômes de FA.

d) Activité

L'activité des vaccins n'est recherchée que sur le produit final formulé (voir paragraphe D.5.b). La charge antigénique peut être utilisée comme un indicateur indirect de l'activité du vaccin, à condition qu'une corrélation ait été établie au préalable entre cette charge antigénique, la réponse en anticorps et la protection contre l'épreuve virulente, et à condition également qu'une épreuve alternative appropriée mesurant la réponse sérologique à la vaccination ait démontré son efficacité.

6. Conservation et suivi des antigènes concentrés

La conservation des antigènes concentrés à très basse température pour les formuler plus tard en vaccin est devenue une option de plus en plus répandue pour la production du vaccin. Cela constitue non seulement la base de la conservation d'antigènes dans une réserve stratégique pour utilisation d'urgence (voir Chapitre 1.1.10., « Lignes directrices pour les normes internationales applicables aux banques de vaccins »), mais permet aussi au fabricant de disposer immédiatement de plusieurs variétés différentes d'antigènes qui peuvent rapidement être formulées et expédiées au client. De telles réserves minimisent plus tard les délais de livraison, particulièrement en cas de demande de vaccins multivalents. Un autre avantage de ce procédé est que de la plupart des contrôles de qualité peuvent être réalisés bien avant l'expédition.

a) Critères d'avant stockage

Les antigènes doivent obligatoirement être contrôlés en utilisant les normes indiquées aux paragraphes D.1–4.

Une attention spéciale doit être portée aux points suivants :

- absence d'agents contaminants étrangers.

Les antigènes doivent être reconnus exempts de tout agent étranger figurant sur la liste fournie par les autorités d'enregistrement.

- sensibilité de la lignée cellulaire utilisée pour détecter un virus résiduel.

Les cellules utilisées pour contrôler l'absence de virus résiduel non inactivé ne conviendront pas si une quantité de virus contenant 1 µg d'antigène 146S présente un titre infectieux inférieur à 10⁶ DECP₅₀ (27).

- procédures d'urgence pour l'agrément provisoire d'un nouveau lot de virus de semence primaire (MSV, *Master Seed Virus*) et subséquemment la libération des vaccins formulés avec cette souche.

En cas d'incursion dans une région, d'une nouvelle souche antigéniquement distincte des souches vaccinales existantes, il peut être nécessaire de développer une nouvelle souche vaccinale à partir d'un isolat représentatif du terrain. Pour être accepté, le nouveau lot de virus de semence primaire doit être reconnu pleinement conforme aux lignes directrices pertinentes, afin de démontrer qu'il est exempt de tous les agents contaminants figurant sur la liste fournie par les autorités d'enregistrement. Ce sera fait en utilisant à la fois des méthodes générales et des méthodes spécifiques et en vérifiant l'homologie du MSV avec l'isolat original. La production des anti-sérums spécifiques qui neutraliseront la nouvelle souche dans les tests généraux de détection des agents contaminants, ainsi que la réalisation d'autres tests qui requièrent des techniques spécifiques, peut prendre beaucoup de temps. Par conséquent, en situation d'urgence et quand le temps est compté pour effectuer tous les contrôles sur le virus de semence, un agrément provisoire de la nouvelle souche vaccinale peut être accordé après une analyse du risque de contamination possible par des agents extérieurs. Cette évaluation du risque devrait tenir compte du fait qu'une procédure validée inactivant les virus enveloppés doit être utilisée lors de la constitution du lot de semence, et que le virus doit être inactivé par l'action d'un produit chimique à cinétique linéaire. Une assurance supplémentaire peu être apportée en demandant que la cinétique de l'inactivation soit enregistrée pour chaque lot produit.

Dans le but d'accélérer la libération des lots du vaccin formulé avec la nouvelle souche, le contrôle d'activité du lot peut être réalisé en utilisant un vaccin formulé avec un lot d'antigène intermédiaire en attendant que tous les lots d'antigène soient produits pour constituer le lot final d'antigène. Ceci permettra de contrôler l'activité de l'antigène dérivé du nouveau lot de semence pendant que le fabricant continuera à constituer une réserve du nouvel antigène.

b) Critères de stockage

• Locaux

Il est important que tous les aspects du stockage de l'antigène concentré soient complètement conformes aux normes internationalement acceptées de Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

• Conservation des antigènes de réserve

Le nombre de doses ou les volumes conservés constitue un point très important, particulièrement quand la réserve est partagée entre Pays Membres, et il y a souvent une variation du nombre de doses considérées comme nécessaires par chacun des pays en cas d'urgence. Il serait sage de stocker les antigènes concentrés dans des unités mises au service de l'utilisateur, afin de faire un meilleur usage des capacités de stockage et de produire des lots de vaccins plus petits. Des récipients de 1 à 2 litres d'antigène concentré peuvent suffire à préparer plus de 30 000 doses de vaccin formulé destiné aux bovins. S'il faut de grandes quantités d'un vaccin particulier, elles ne peuvent être produites que par plusieurs chaînes de production distinctes. Les responsables de banque de vaccins doivent considérer la nécessité soit de formuler chaque lot en un mélange représentatif final pour les besoins des contrôles, soit de mélanger les lots individuels dans un lieu pratique pour cela, afin de faciliter la formulation et/ou de contrôles.

Le type de récipient utilisé pour conserver les antigènes concentrés est important. À très basses températures, il est important que la matière constituant le récipient ne devienne pas cassante et fragile. Un bon récipient est constitué par exemple de bouteilles moulées en polymères fluorés. Les bouteilles en polyfluoro-alkoxy (PFA) peuvent ainsi résister à des températures allant de -270 °C à +250 °C.

• Étiquetage des antigènes conservés

Bien qu'il existe des lignes directrices nationales et internationales concernant l'étiquetage des produits médicaux à usage vétérinaire, il n'existe rien de tel pour les matériaux stockés en cas d'urgence. C'est le cas notamment des composants antigéniques des vaccins, parce que ces composants sont considérés par les instances réglementaires comme du matériel « intermédiaire ». À des températures très basses, les modes d'étiquetage doivent être durables. Par expérience, les bouteilles portant une étiquette en métal assez grosse pour pouvoir y inscrire tous les détails nécessaires et fixée par un fil sont bien préférables. Ces détails doivent concerner la souche vaccinale/antigénique, le numéro de lot, la date de réception ainsi que le numéro du récipient ou du stock. Cette information doit être facile à lire et portée sur l'étiquette au crayon marqueur indélébile. Des étiquettes en aluminium ont été utilisées dans ce but, et elles peuvent être de différentes couleurs pour aider à identifier et récupérer les bouteilles, surtout quand plusieurs souches sont placées dans le même conteneur. Les informations peuvent être aussi gravées de manière permanente sur ces étiquettes métalliques.

- **Suivi**

Il est très important que les antigènes concentrés soient conservés de façon optimale et surveillés régulièrement dans leurs performances pour être bien sûr de leur efficacité au moment de leur utilisation. En conséquence des dispositions doivent être prises pour contrôler si nécessaire leurs performances de manière régulière et pour inclure à intervalles de temps appropriés une série d'épreuves permettant de s'assurer de l'intégrité des composants antigéniques et d'une bonne activité du produit fini. Par exemple, la surveillance de la température de stockage est normalement assurée et enregistrée dans les banques de vaccins de la FA, tout comme l'inspection périodique des bouteilles contenant les antigènes afin de repérer toute fissure ou fuite éventuelles. Selon leur type, leur volume et les modalités de conservation, les dépôts d'antigène pourront aussi être pesés chaque année pour vérifier qu'ils ne se soient pas lyophilisés. Quelques banques de vaccins FA ont adopté des épreuves physicochimiques, comme l'analyse par gradient de densité en sucrose, pour suivre l'intégrité des antigènes et donc leur stabilité dans le temps et quelques autres ont aussi employé des tests *in vivo*. Néanmoins, depuis qu'il a été démontré que le délai de péremption des antigènes concentrés de la FA dépasse vraisemblablement 15 ans quand ils sont conservés à très basse température, une approche physico-chimique des contrôles apparaît suffisante.

Le calendrier de contrôles suivant est proposé pour la validation et la re-validation des stocks d'antigènes

Temps	Contrôles
À la réception (année 0) et ensuite tous les 5 ans.	Quantification des 146S * Le contrôle d'activité sur bovins peut se fonder sur des méthodes sérologiques si la protection a bien été corrélée avec les anticorps pour cet antigène, ou le responsable peut décider de procéder à un contrôle « tronqué »** pour démontrer que la puissance vaccinale reste au dessus du minimum requis. Mais attention cette dernière méthode de contrôle est incomplète et sous-estime la puissance vaccinale. (voir section sur les contrôles d'activité)
Années 2 et 4, et juste avant formulation en cas de besoin.	Quantification des 146S
Tous les 5 ans	Evaluation de toutes les données des cinq années précédentes pour savoir s'il faut remplacer l'antigène.

* D'autres contrôles physico-chimiques comme le SDS-PAGE ont été utilisés pour évaluer l'intégrité de VP1, mais ils n'ont pas été suffisamment validés pour être utilisables en routine.

** Dans un contrôle « tronqué » tous les animaux du groupe suivant celui qui a été contrôlé, et qui ont donc reçu une quantité de vaccin inférieure, sont considérés comme non protégés. Cette épreuve donne de ce fait une DP₅₀ artificiellement inférieure, mais elle réduit le nombre d'animaux requis.

Pour permettre ces contrôles dans les banques d'antigène, il faut prévoir plusieurs petits échantillons représentatifs du stock d'antigènes concentrés. Ces petites aliquotes des stocks d'antigènes de la FA sont généralement constituées d'environ un milligramme d'antigène.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ADAMOWICZ PH., LEGRAND B., GUERCHE J. & PRUNET P. (1974). Un nouveau procédé de concentration et de purification du virus. Application du virus de la fièvre aphteuse produit sur cellules BHK21 pour l'obtention des vaccins hautement purifiés. *Bull. OIE*, **81**, 1125–1150.
2. ALEXANDERSEN S., ZHANG Z., REID S.M., HUTCHINGS G.H., DONALDSON A.I. (2002). Quantities of infectious virus and viral RNA recovered from sheep and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus O UK 2001. *J. Gen. Virol.*, **83** (8), 1915–1923.
3. ALONSO F.A. (1986). Manual de Diagnostico de Laboratorio de las Enfermedades Vesiculares, Panaftosa.
4. ALONSO F.A., CASAS OLASCOAGA R.C., ASTUDILLO V.M., SONDAHL M.S., GOMES I. & VIANNA FILHO Y.L. (1987). Updating of foot-and-mouth disease virus strains of epidemiological importance in South America. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, **53**, 11–18.

5. ALONSO A., GOMES M.D., RAMALHO A.K., ALLENDE R., BARAHONA H., SONDHAL M. & OSÓRIO F. (1993). Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. *Viral Immunol.*, **6** (3), 219–228.
6. ALONSO A., MARTINS M.A., GOMES D.M.P., ALLENDE R. & SONDAHL M.S. (1992). Foot-and-mouth disease virus typing by complement fixation and enzyme-linked immunosorbent assay using monovalent and polyvalent antisera. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**, 249–253.
7. AMAREL-DOEL C.M.F., OWEN N.E., FERRIS N.P., KITCHING R.P. & DOEL T.R. (1993). Detection of foot-and-mouth disease viral sequences in clinical specimens and ethyleneimine-inactivated preparations by the polymerase chain reaction. *Vaccine*, **11**, 415–421.
8. AUGÉ DE MELLO P., GOMES I. & BAHNEMANN H.G. (1989). The vaccination of young cattle with an oil adjuvant foot-and-mouth disease vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre. Aftosa*, **55**, 3–14.
9. BAHNEMANN H.G. (1975). Binary ethyleneimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.*, **47**, 47–56.
10. BAHNEMANN H.G. (1990). Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethyleneimine. *Vaccine*, **8**, 299–303.
11. BARNETT P.V., PULLEN L., WILLIAMS L. & DOEL T.R. (1996). International bank for foot-and-mouth disease vaccine: assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants. *Vaccine*, **14**, 1187–1198.
12. BARTELING S.Z. & VREESWIJK Z. (1991). Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, **9**, 75–88.
13. BASTOS A.D.S. (1998). Detection and characterization of foot-and-mouth disease virus in sub-Saharan Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **65**, 37–47.
14. BERGMANN I.E., MALIRAT V., NEITZERT E., PANIZUTTI N., SANCHEZ C. & FALCZUK A. (2000). Improvement of serodiagnostic strategy for foot and mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot. *Arch. Virol.*, **145**, 473–489.
15. BERGMANN I.E., NEITZERT E., MALIRAT V., ORTIZ S., COLLING A., SANCHEZ C. & CORREA MELO E. (2003). Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay and its use as an epidemiological indicator of foot-and-mouth disease viral activity. *Arch. Virol.*, **148**, 891–901.
16. BERGMANN I.E., TIRABOSCHI B., MAZZUCA G., FERNANDEZ E., MICHAILHOFF C.A., SCODELER E. & LA TORRE J.L. (1988). Serological and biochemical analysis of foot-and-mouth disease virus (serotype C3) isolated in Argentina between 1981 and 1986. *Vaccine*, **6**, 245.
17. BROCCHI E., BERGMANN I.E., DEKKER A., PATON D.J., SAMMIN D.J., GREINER M., GRAZIOLI S., DE SIMONE F., YADIN H., HAAS B., BULUT N., MALIRAT V., NEITZERT E., GORIS N., PARIDA S., SORESENSEN K. & DE CLERCQ K. (2006). Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* (submitted).
18. CALLAHAN J.D., BROWN F., CSORIO F.A., SUR J.H., KRAMER E., LONG G.W., LUBROTH J., ELLIS S.J., SHOULARS K.S., GAFFNEY K.L., ROCK D.L. & NELSON W.M. (2002). Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **220** (11), 1636–1642.
19. CLARKE J.B. & SPIER R.E. (1980). Variation in the susceptibility of BHK populations and cloned cell lines to three strains of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.*, **63**, 1–9.
20. DE DIEGO M., BROCCHI E., MACKAY D. & DE SIMONE F. (1997). The use of the non-structural polyprotein 3ABC of FMD virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch. Virol.*, **142**, 2021–2033.
21. DOEL T.R. & BACCARINI P.J. (1981). Thermal stability of FMDV. *Arch. Virol.*, **70**, 21–32.
22. DOEL T.R. & COLLEN T. (1982). Qualitative assessment of 146S particles of FMDV in preparations destined for vaccines. *J. Biol. Stand.*, **10**, 69–81.

23. DOEL T.R., FLETTON B. & STAPLE R.F. (1982). Further developments in the quantification of small RNA viruses by UV photometry of sucrose density gradients. *Dev. Biol. Stand.*, **50**, 209–219.
24. DOEL T.R. & PULLEN L. (1990). International bank for foot-and-mouth disease vaccines: stability studies with virus concentrates and vaccines prepared from them. *Vaccine*, **8**, 473–478.
25. DOEL T.R. & STAPLE R.F. (1982). The elution of FMDV from vaccines adjuvanted with aluminium hydroxide and with saponin. *J. Biol. Stand.*, **10**, 185–195.
26. DOEL T.R., WILLIAMS L. & BARNETT P.V. (1994). Emergency vaccination against foot-and-mouth disease. The rate of development of immunity and its implications for the carrier state. *Vaccine*, **12**, 592–600.
27. EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2008). Version 6.1. Monograph No. 63. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France.
28. FERRIS N.P. & DAWSON M. (1988). Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular disease. *Vet. Microbiol.*, **16**, 201–209.
29. FERRIS N.P. & DONALDSON A.I. (1992). The World Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease: a review of thirty-three years of activity (1958–1991). *Rev. sci. tech. Off. int. epiz.*, **11** (3), 657–684.
30. FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1984). Emerging Diseases of Livestock. Vol. 1. The Diseases and their Diagnosis, Geering W.A., ed. FAO, Rome, Italy, 43–51.
31. FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1997). Potency assessment of inactivated viral vaccines. In: FAO Animal Production and Health Series No 35. Vaccine Manual. The Production and Quality Control of Veterinary Vaccines for use in Developing Countries, Mowat N. & Rweyemamu M., eds. FAO, Rome, Italy, 395–409.
32. GOLDING S.M., HEDGER R.S., TALBOT P. & WATSON J. (1976). Radial immunodiffusions and serum neutralisation techniques for the assay of antibodies to swine vesicular disease. *Res. Vet. Sci.*, **20**, 142–147.
33. GORIS N. & DE CLERCQ K. (2005). Quality assurance/quality control of foot and mouth disease solid phase competition enzyme-linked immunosorbent assay – Part I. Quality assurance: development of secondary and working standards. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24** (3), 995–1004.
34. GORIS N. & DE CLERCQ K. (2005). Quality assurance/quality control of foot and mouth disease solid phase competition enzyme-linked immunosorbent assay – Part II. Quality control: comparison of two charting methods to monitor assay performance. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24** (3), 1005–1016.
35. HAMBLIN C., BARNETT I.T.R. & HEDGER R.S. (1986). A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA. *J. Immunol. Methods*, **93**, 115–121.
36. HAMBLIN C., KITCHING R.P., DONALDSON A.I., CROWTHER J.R. & BARNETT I.T.R. (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. 3. Evaluation of antibodies after infection and vaccination. *Epidemiol. Infect.*, **99**, 733–744.
37. HERBERT W.J. (1965). Multiple emulsions. A new form of mineral-oil antigen adjuvant. *Lancet*, **II**, 771.
38. KÄRBER G. (1931). Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Archive für Experimentelle Pathologie Pharmakologie*, **162**, 480–483.
39. KITCHING R.P. & DONALDSON A.I. (1987). Collection and transportation of specimens for vesicular virus investigation. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **6**, 263–272.
40. KITCHING R.P., RENDLE R. & FERRIS N.P. (1988). Rapid correlation between field isolates and vaccine strains of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, **6**, 403–408.
41. MACKAY D.K., BULUT A.N., RENDLE T., DAVIDSON F. & FERRIS N.P. (2001). A solid-phase competition ELISA for measuring antibody to foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods*, **97** (1–2), 33–48.

42. MACKAY D.K.J., FORSYTH M.A., DAVIES P.R., BERLINZANI, A., BELSHAM G.J., FLINT M. & RYAN M.D. (1997). Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. *Vaccine*, **16**, 446–459.
43. MCCULLOUGH K.C., DE SIMONE F., BROCCHI E., CAPUCCI L., CROWTHER J.R. & KIHM U. (1992). Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J. Virol.*, **66** (4), 1835–1840.
44. MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (1986). Foot-and-mouth disease. Ageing of lesions. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
45. NEIZERT E., BECK E., AUGÉ DE MELLO P., GOMES I. & BERGMANN I.E. (1991). Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered non-structural antigens in detection of larger persistent infections. *Virology*, **184**, 799–804.
46. PAIBA G.A., ANDERSON J., PATON D.J., SOLDAN A.W., ALEXANDERSEN S., CORTEYN M., WILSDEN G., HAMBLIN P., MACKAY D.K. & DONALDSON A.I. (2004). Validation of a foot-and-mouth disease antibody screening solid-phase competition ELISA (SPCE). *J. Virol. Methods*, **115**, 145–158.
47. PANAFITOSA (PAN-AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER) (2001). Final recommendations of the Seminario internacional de Control de Vacuna Antiaftosa, Panafitosa, Rio de Janeiro, Brazil, 10–14 September.
48. PATON D.J., VALARCHER J.-F., BERGMANN I., MATLHO O.G., ZAKHAROV V.M., PALMA E.L. & THOMSON G.R. (2005). Selection of foot-and-mouth disease vaccine strains – a review. *Rev. sci. tech. Off. int. epiz.*, **24**, 981–993.
49. PEREIRA H.G. (1977). Subtyping of foot and mouth disease virus. *Dev. Biol. Stand.*, **35**, 167–174.
50. REID S., FERRIS N.P., HUTCHINGS G.H., SAMUEL A.R. & KNOWLES N.J. (2000). Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **89**, 167–176.
51. REID S., FERRIS N.P., HUTCHINGS G.H., ZHANG Z., BELSHAM G.J., ALEXANDERSEN S. (2001). Diagnosis of foot-and-mouth disease by real-time fluorogenic PCR assay. *Vet. Rec.*, **149**, 621–623.
52. REID S. M., GRIERSON S.S., FERRIS N.P., HUTCHINGS G. H. & ALEXANDERSEN S. (2003). Evaluation of automated RT-PCR to accelerate the laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods*, **107** (2), 129–139.
53. ROEDER P.L. & LE BLANC SMITH P.M. (1987). The detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Res. Vet. Sci.*, **43**, 225–232.
54. RWEYEMAMU M.M. (1984). Antigenic variation in foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction. *J. Biol. Standards*, **12** (3), 323–337.
55. RWEYEMAMU M.M., BOOTH J.C., HEAD M.M. & PAY T.W.F. (1978). Microneutralisation tests for serological typing of foot and mouth disease virus strains. *J. Hyg.*, **8**, 107–102.
56. RWEYEMAMU M.M. & HINGLEY P.J. (1984). Foot and mouth disease virus strain differentiation: analysis of the serological data. *J. Biol. Stand.*, **12**, 225–229.
57. SAMUEL A.R., OULDRIDGE E.J., ARROWSMITH A.E.M., KITCHING R.P. & KNOWLES N.J. (1990). Serological analysis of type O isolates of FMD from the Middle East 1981–88. *Vaccine*, **8**, 390–395.
58. SKINNER H.H. (1960). Some techniques for producing and studying attenuated strains of the virus of foot and mouth disease. *Bull. OIE*, **53**, 634–650.
59. SORENSEN K.J., MADSEN K.G., MADSEN E.S., SALT J.S., NQUINDI J. & MACKAY D.K.J. (1998). Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch. Virol.*, **143**, 1461–1476.
60. STREBEL K., BECK E., STROHMAIER D. & SCHALLER H. (1986). Characterisation of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesised fusion proteins. *J. Virol.*, **57**, 983–991.

61. VIANNA FILHO Y.L., ASTUDILLO V., GOMES I., FERNANDEZ G., ROZAS C.E.E., RAVISON J.A. & ALONSO A. (1993). Potency control of foot-and-mouth disease vaccine in cattle. Comparison of the 50% protective dose and protection against generalisation. *Vaccine*, **11–14**, 1424–1428.
62. WAGNER G.G., CARD J.L. & COWAN K.M. (1970). Immunochemical studies of foot-and-mouth disease virus. VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by polyethylene glycol precipitation. *Arch. Ges. Virusforsch.*, **30**, 343–352.
63. WOODBURY E.L., ILOTT M.C., BROWN C.C. & SALT J.S. (1995). Optimization of an in situ hybridization technique for the detection of foot-and-mouth disease virus in bovine tissues using the digoxigenin system. *J. Virol. Methods*, **51**, 89–94.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la Fièvre aphteuse (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel Terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

COWDRIOSE

RÉSUMÉ

La cowdriose (ou « heartwater ») est une rickettsiose aiguë, mortelle, non-contagieuse des ruminants provoquée par Ehrlichia ruminantium (antérieurement Cowdria ruminantium) et transmise par les tiques du genre Amblyomma. Elle est répandue dans la presque totalité de l'Afrique subsaharienne, dans les îles avoisinantes du continent africain et dans certaines îles des Caraïbes d'où elle menace le continent américain. La maladie peut entraîner une mortalité élevée (jusqu'à 90 %) chez les ruminants domestiques sensibles. Les chèvres et les moutons sont plus sensibles que les bovins, et les races européennes sont, en général, plus sensibles que les races indigènes africaines.

Cliniquement, la maladie se présente le plus souvent sous une forme aiguë qui est caractérisée par une fièvre soudaine et élevée, de la dépression, des symptômes nerveux et un taux de mortalité élevé. Un hydropéricarde, un hydrothorax et un œdème pulmonaire sont des lésions souvent observées à l'autopsie. Des formes aiguës et suraiguës peuvent survenir ; dans le premier cas, le taux de mortalité est élevé sans beaucoup de signes cliniques visibles, tandis que dans le deuxième cas le taux de guérison est plus élevé.

Les animaux guéris deviennent porteurs de l'infection. Certains animaux sauvages peuvent jouer le rôle de réservoir. Les cerfs Rusa, les cerfs de Virginie et les springboks sont sensibles à l'infection et peuvent présenter une mortalité élevée.

Identification de l'agent pathogène : *le diagnostic spécifique de cowdriose est basé sur l'observation de colonies d'E. ruminantium dans les cellules endothéliales des vaisseaux capillaires cérébraux. En absence d'instruments appropriés, une portion de cerveau peut être prélevée avec une curette introduite par le foramen magnum après avoir coupé la tête de l'animal. Un prélèvement de cortex cérébral peut aussi être obtenu par un orifice effectué dans le crâne avec un clou et un marteau. Les frottis de cerveau sont préparés par écrasement puis étalés en tranches fines d'une petite fraction de cortex cérébral ou cérébelleux entre deux lames de microscope qui sont ensuite glissées l'une sur l'autre en sens inverse afin d'obtenir un étalement des vaisseaux capillaires en une monocouche cellulaire. Les frottis sont séchés à l'air, fixés au méthanol et colorés au Giemsa. Avec les colorants rapides les frottis peuvent être fixés et colorés en moins d'une minute. Les colonies sont de couleur pourpre à bleu et très souvent accolées au noyau des cellules infectées. Elles peuvent être rares et difficiles à trouver, particulièrement dans les formes aiguës, mais elles sont toujours présentes dans le cerveau des ruminants qui meurent de cowdriose s'ils n'ont pas été traités auparavant. En revanche, il est vraisemblable que les colonies ne seront pas observables chez les animaux qui ont été traités avec des antibiotiques. Les colonies sont encore visibles 2 jours après la mort dans un cerveau qui a été conservé à température ambiante (de 20 °C à 25 °C) et jusqu'à 34 jours dans un cerveau conservé au réfrigérateur (4 °C).*

Du sang frais prélevé chez les animaux suspects peut être inoculé par voie intraveineuse chez un mouton ou une chèvre sensible. L'observation de signes cliniques et d'E. ruminantium dans le cerveau des animaux inoculés durant la phase fébrile a une valeur diagnostique de cowdriose. Cette méthode doit cependant autant que possible être évitée pour des considérations de bien être animal.

E. ruminantium peut être isolée du sang d'un hôte infecté par culture sur des cellules endothéliales de ruminants. Quand l'effet cytopathogène consistant en plages de lyse apparaît, la présence de

morulae caractéristiques est confirmée par coloration du tapis cellulaire à l'éosine bleu de méthylène, ou par immunofluorescence ou immunoperoxidase en utilisant un antisérum spécifique.

Les sondes ADN et les méthodes encore plus sensibles d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sont disponibles pour révéler la présence d'*E. ruminantium* dans le sang d'animaux présentant des signes cliniques et chez la tique vectrice, et à un moindre degré dans le sang ou la moelle osseuse d'animaux porteurs. En plus du diagnostic, la PCR est largement utilisée pour les recherches sur le génome d'*E. ruminantium* et dans les études épidémiologiques.

Épreuves sérologiques : les épreuves sérologiques disponibles incluent l'immunofluorescence indirecte, les réactions immuno-enzymatiques (ELISA) et le Western blotting. Cependant quand les antigènes sont constitués d'*E. ruminantium* entières, des réactions croisées avec d'autres *Ehrlichia* spp existent quel que soit l'épreuve utilisée. Les applications de la sérologie au diagnostic sont limitées.

Un ELISA récemment mis au point, l'ELISA MAP1B, utilise un antigène recombiné exprimé sous forme d'un fragment partiel de la protéine antigénique recombiné majeure (MAP1 = Major Antigenic Protein). Ce test a montré une amélioration très importante de la spécificité par rapport aux anciennes épreuves. Bien que cette épreuve soit plus spécifique, elle continue à détecter des réactions croisées avec d'autres *Ehrlichia*. Le diagnostic définitif de cowdriose repose donc sur des arguments épidémiologiques et des études moléculaires complémentaires pour garantir la présence de la bactérie. Ce test ELISA a rendu l'interprétation des résultats sérologiques plus fiables dans les régions où d'autres infections à *Ehrlichia* existent. Il peut être utilisé pour le suivi des infections expérimentales et pour évaluer la réponse immunitaire d'animaux immunisés dont l'historique avant immunisation est connu. L'emploi de la sérologie pour le diagnostic est limité, puisque les animaux cliniquement malades ne présentent pas d'anticorps pendant la phase fébrile et ne développent ces anticorps qu'après guérison.

La sérologie n'est pas non plus efficace pour éprouver les animaux avant importation. Lors d'importation d'animaux en provenance d'une zone où la cowdriose est enzootique, il convient d'étudier les données épidémiologiques pour vérifier que les troupeaux et les tiques locales ne sont pas infectés. En outre, des épreuves de PCR répétées devraient être réalisées afin de démontrer l'absence de l'agent pathogène au sein du troupeau.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : l'immunisation contre la cowdriose par la méthode « d'infection et traitement » qui utilise du sang infectieux est encore utilisée dans certains pays. Un vaccin de première génération constitué de corps élémentaires inactivés d'*E. ruminantium* émulsifiés dans l'adjuvant Montanide ISA 50 a donné des résultats prometteurs en conditions expérimentales contrôlées et a démontré un pouvoir protecteur significatif sur le terrain. Un autre isolat, Welgevonden, a été atténué ; il s'est révélé induire une bonne protection, et une protection non négligeable a aussi été obtenue par vaccination avec de l'ADN. Cependant, aucun de ces vaccins expérimentaux n'a été vraiment validé dans les conditions du terrain. Des études de terrain ont révélé une grande diversité antigénique, ce qui est important pour la formulation des vaccins, des recherches supplémentaires sont indispensables avant la mise en circulation d'un vaccin.

A. INTRODUCTION

La cowdriose est une rickettsiose des ruminants due à *Ehrlichia ruminantium* (auparavant *Cowdria ruminantium*) et transmise par les tiques du genre *Amblyomma* (3, 8, 36). Elle est aussi dénommée malkopsiekte (Afrikaner), péricardite exsudative infectieuse (français), hidrocárditis infecciosa (Portugais), idropericardite dei ruminanti (Italien), et possède une variété d'autres noms dans divers langages africains (5). *E. ruminantium* est classée dans l'ordre des Rickettsiales et la famille des *Anaplasmataceae*, avec le genre *Anaplasma*. Bien que les ruminants soient la première cible de l'agent pathogène, une infection canine qui pourrait être due à *E. ruminantium* a été signalée en Afrique du Sud (1), et plus récemment, *E. ruminantium* a été soupçonné dans plusieurs cas d'encéphalite humaine à issue rapidement fatale (14). Cependant, dans tous les cas la preuve de l'infection à *E. ruminantium* était basée sur une détection avec des techniques moléculaires. L'isolement et la caractérisation de l'agent infectieux est nécessaire avant de considérer que *E. ruminantium* est un agent pathogène émergent chez des espèces autres que les ruminants, notamment les humains.

La cowdriose est répandue dans la presque totalité des pays d'Afrique sub-saharienne où les tiques du genre *Amblyomma* sont présentes, ainsi que dans les îles du pourtour africain : Madagascar, La Réunion, île Maurice,

Les Comores et Sao Tomé et Príncipe. La maladie est aussi rapportée dans les Caraïbes (Guadeloupe, Marie-Galante et Antigua) (34), d'où elle menace le continent américain. Tous les ruminants domestiques et sauvages peuvent être infectés, mais les premiers sont les plus sensibles. Les ruminants domestiques indigènes sont généralement plus résistants à la maladie. Les animaux sauvages peuvent jouer le rôle de réservoir, mais le cerf Rusa, le cerf de Virginie, le springbok, le chital qui sont utilisés comme animaux de rente semblent être les principales espèces de ruminant sauvage chez qui la cowdriose peut avoir un impact économique important (36).

L'incubation naturelle moyenne est de 2 à 3 semaines, mais elle peut varier de 10 jours à 1 mois. Dans la plupart des cas la cowdriose est une maladie fébrile aiguë, avec une augmentation subite de la température corporelle qui peut dépasser 41°C en 1 à 2 jours après le début de l'hyperthermie. Elle demeure élevée pendant 4 à 5 semaines, avec de petites fluctuations et chute peu avant la mort.

La fièvre est suivie d'inappétence, parfois d'apathie, de diarrhée particulièrement chez les bovins (4), et de dyspnée révélatrice d'un œdème pulmonaire. Les signes nerveux apparaissent progressivement. L'animal est apathique, marche en cercle, fait des mouvements de succion et a une station rigide avec des tremblements des muscles superficiels. Les bovins « poussent au mur » ou ont un comportement agressif ou anxieux. Finalement, les animaux tombent au sol avec des mouvements de pédalage et un opisthotonos, présentent un nystagmus et des mouvements de mastication. Les animaux meurent généralement pendant ou à la suite d'une telle crise.

Des formes sub-aiguës avec des signes moins prononcés, et des formes sur-aiguës avec mort soudaine peuvent aussi survenir selon la race de ruminant et la souche d'*E. ruminantium* impliquée.

Les lésions macroscopiques les plus communes sont l'hydropéricarde, l'hydrothorax, l'œdème pulmonaire, la congestion intestinale, l'œdème des nœuds médiastinaux et bronchiaux (4), des pétéchies sur le péricarde et l'endocarde, la congestion cérébrale et une splénomégalie modérée.

Le diagnostic de présomption de cowdriose est basé sur la présence des vecteurs *Amblyomma*, de signes nerveux et de transsudats dans les cavités péricardique et thoracique à l'examen *post mortem*. Lors du diagnostic clinique, les maladies suivantes doivent être prises en compte : la babésiose cérébrale bovine, la theilériose, l'anaplasmose, le botulisme, l'haemonchose chez les petits ruminants, la rage et les empoisonnements.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Au cours de la phase fébrile, *E. ruminantium* peut facilement être isolé en culture à partir du sang ou du plasma ; cependant, il est difficile de détecter ces bactéries dans des frottis de sang. Des colonies typiques d'*E. ruminantium* peuvent être observées dans les frottis de cerveau après la mort, ce qui autorise un diagnostic définitif de cowdriose.

Il n'est pas nécessaire d'ouvrir la boîte crânienne. Une alternative (42) est de couper la tête de l'animal en avant de la première vertèbre cervicale. Puis une curette est introduite au travers du *foramen magnum* entre la moelle et les méninges. La curette est retournée vers le cerveau et retirée avec une portion de cervelet. Une autre méthode consiste à faire un trou dans le crâne avec un marteau et un gros clou, puis à aspirer une fraction de cerveau avec une aiguille et une seringue. Ces méthodes diminuent aussi le danger pour l'opérateur au cas où les signes nerveux seraient dus à la rage.

Chez l'animal vivant, une biopsie de cerveau peut être obtenue stérilement et sans danger après anesthésie locale, bien qu'avec difficulté ; une contention appropriée est indispensable, notamment pour les gros animaux à cornes. Les colonies d'*Ehrlichia* sont observées pendant la période de fièvre. La méthode est utile pour les études expérimentales mais non souhaitable pour le diagnostic de routine.

Les colonies d'*E. ruminantium* sont encore présentes 48 h après la mort dans un cerveau conservé à température ambiante (20 - 25 °C) et jusqu'à 34 jours dans un cerveau conservé au réfrigérateur à 4 °C (5).

Un petit fragment de matière grise (de la taille d'une tête d'allumette) est placé sur une lame de microscope, écrasé pour donner une consistance pâteuse à l'aide d'une autre lame. Tout en maintenant la pression, les lames sont glissées l'une sur l'autre sur toute leur longueur pour obtenir une seule couche de cellules. Les lames sont séchées à l'air, fixées au méthanol, colorées au Giemsa dilué dans du tampon Sörensen (2,54 g de KH₂PO₄ ; 8,55 g de Na₂HPO₄.H₂O ; q.s.p 5 litres d'eau distillée), pH 7,2, et rincées à l'eau courante. Les colorations de Giemsa rapide (DiffQuick, RAL555, CAM's Quick stain) donnent des résultats plus rapides, mais le contraste des couleurs est généralement de moins bonne qualité. Certains colorants rapides donnent un excellent contraste, par exemple le colorant Hema 3.

Les lames sont examinées au microscope à un faible grossissement (objectif $\times 10$) afin de rechercher les capillaires cérébraux. Un objectif à immersion d'un grossissement d'au moins $\times 50$ est utile pour l'identification des colonies de rickettsies. L'identification des colonies d'*E. ruminantium* requiert de l'expérience pour les différencier des hémoparasites (*Babesia bovis*), certaines cellules sanguines (thrombocytes, granulocytes), les structures subcellulaires normales (mitochondries, granules de mastocytes), ou des artefacts de coloration (précipités de colorants), etc. La spécificité de la lecture peut être améliorée par coloration par la méthode d'immunoperoxydase de coupes histologiques de cerveau fixées au formol.

Les colonies d'*E. ruminantium* sont formées d'agrégats de granules (0,2 à 0,5 μm) parfois organisés en anneaux ou en fer à cheval (1 à 3 μm) et qui sont positionnés près du noyau à l'intérieur de la cellule endothéliale. Les granules peuvent être rares, particulièrement dans les formes suraiguës, mais ils sont toujours présents dans le cerveau d'un animal qui est mort de cowdriose. Cependant, si l'animal a subi un traitement avec de la doxycycline ou de la tétracycline 48 h avant, les granules d'*Ehrlichia* tendent à se lyser, ce qui rend le diagnostic très difficile voire impossible.

Du sang frais prélevé chez les animaux suspects peut être inoculé par voie intraveineuse chez un mouton ou une chèvre sensible. L'observation de signes cliniques et d'*E. ruminantium* dans le cerveau des animaux inoculés a une valeur diagnostic de cowdriose.

La microscopie électronique à transmission a été utilisée pour démontrer que les *E. ruminantium* se développent à l'intérieur d'une structure vacuolaire entourée par la membrane cytoplasmique de la cellule endothéliale (39). Chaque organisme est entouré d'une double membrane. Dans les structures vacuolaires, on peut identifier des formes denses aux électrons (corps élémentaires), ainsi que des formes intermédiaires réticulées.

a) Isolement de *Ehrlichia ruminantium* en culture *in vitro*

L'isolement d'*E. ruminantium* en culture de cellules n'est pas l'épreuve de choix pour confirmer le diagnostic de cowdriose, car la procédure réclame beaucoup de travail et est très longue bien que diverses lignées cellulaires permettent sa culture. Pour un diagnostic rapide, l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ou les techniques moléculaires sont préférables. L'isolement d'*E. ruminantium* est cependant nécessaire pour caractériser les souches présentes dans une région pour les programmes de vaccination. *E. ruminantium* peut être isolée du sang d'animaux en phase de réaction clinique par culture dans des cellules endothéliales de ruminants (45). Les cellules endothéliales de cordon ombilical, aorte, ou d'artère pulmonaire de différentes espèces de ruminants (bovins, moutons, chèvres) sont utilisées le plus souvent pour l'isolement, bien que d'autres types de cellules endothéliales (capillaires cérébraux, cellules endothéliales circulantes, etc.) ont été décrites pour la culture du micro-organisme. Des cellules endothéliales d'oryx, d'élan, de buffle, de koudou et de phacochères peuvent également être utilisées pour la culture d'*E. ruminantium*. Aucune lignée cellulaire de référence n'a été définie pour l'isolement.

• Protocole d'isolement

- i) Le sang d'un animal en phase clinique (le moment idéal pour la détection de la bactérie est le 2^e ou le 3^e jour de la fièvre) est prélevé sur anticoagulant (héparine ou citrate de sodium, mais pas sur de l'acide éthylène diamine tétra-acétique) et dilué au 1/2 dans du milieu essentiel minimum de Glasgow (Glasgow MEM) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal inactivé, 2,95 mg/ml de bouillon tryptose phosphate, 200 mM de L-glutamine, et d'antibiotiques si nécessaire (100 unités internationales (UI)/ml de pénicilline, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycine).
- ii) Le milieu de culture est retiré de la monocouche de cellules endothéliales et du sang infectieux (environ 2 ml pour un flacon de 25 cm^2) est ajouté. Le flacon est placé à l'incubateur à 37 °C sur un agitateur oscillant pendant 2 h.
- iii) Après incubation, le sang est retiré et le tapis cellulaire est rincé 3 fois précautionneusement avec du milieu de culture préchauffé à 37 °C. Du milieu de culture neuf est ensuite ajouté et le flacon placé à l'incubateur à 37 °C. Le milieu de culture est changé 2 fois par semaine.

(L'utilisation de plasma à la place du sang est plus efficace quand il est prélevé sur un animal présentant une réaction fébrile > 41 °C. Dans ce cas, les étapes ii) et iii) ci-dessus peuvent être remplacées comme suit :

- Ensemencer 4 ml de plasma (un inoculum plus petit peut être utilisé si la quantité de plasma est insuffisante) sur un tapis de cellules endothéliales sensibles et incubé 1 h à 7 °C sur un agitateur oscillant.
 - Enlever le plasma et rincer avec du milieu de culture puis ajouter 5 ml de milieu de culture (pour un flacon de 25 cm^2). Suivre le développement d'un effet cytopathogène.
- iv) Le tapis cellulaire est observé régulièrement pour détecter l'apparition des petites plages de lyse. Les premières plages apparaissent généralement après 2 semaines. Le passage sur un nouveau tapis cellulaire sain est effectué quand la lyse atteint environ 80 % du tapis infecté. Les cellules restantes

sont colorées à l'éosine bleu de méthylène, par la méthode de Giemsa ou DiffQuick et observées au microscope afin de rechercher la présence de morula d'*E. ruminantium*. Les cellules peuvent aussi être colorées par une épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) ou d'immunoperoxidase utilisant un anticorps spécifique d'*E. ruminantium* : le test d'immunoperoxidase n'est pas utilisé en routine.

b) Isolement d'*Ehrlichia ruminantium* in vivo

Il est possible de déterminer la présence de cowdriose dans un troupeau, une région ou un pays, ou d'isoler une nouvelle souche d'*E. ruminantium*, par inoculation de sang ou un homogénat de tiques à un animal sensible. Cependant, en raison de considérations de bien être animal, cette méthode n'est pas recommandée. Le sang d'animaux individuels ou un pool de sang est injecté lentement à une dose de 10 à 100 ml par voie intra-veineuse à un mouton ou une chèvre sensible. Le sang qui sert d'inoculum (pour déterminer le statut infectieux du troupeau) n'est infectieux que si des animaux cliniquement infectés sont présent dans le troupeau ; cependant, cette méthode ne détectera que rarement les animaux guéris porteurs. Une autre méthode consiste à collecter et à broyer des tiques *Amblyomma* adultes, et après centrifugation de l'homogénat à inoculer le surnageant à un animal sensible. Cette dernière méthode est plus sensible que celle du sang d'animaux infectés (spécialement de sang d'animaux guéris), car la concentration d'*E. ruminantium* est plus élevée dans les tiques que dans le sang. Cependant, le taux d'infection des tiques sur le terrain est variable et parfois à peine de 1 % (6). Dans ce cas, pour détecter une infection, au moins 100 tiques sont nécessaires et davantage si possible. Dans les deux cas, l'inoculum additionné de 10 % (concentration finale) de diméthyl sulfoxyde peut être conservé en azote liquide pendant plusieurs années. Il faut noter que l'inoculation de tiques à un animal sensible peut provoquer une réaction d'anaphylaxie, qui peut être prévenue par l'administration simultanée d'adrénaline. Le développement de signes cliniques et la détection de rickettsies circulantes par des méthodes moléculaires et/ou la démonstration d'*E. ruminantium* dans le cerveau d'un ruminant inoculé, ou au 2^e ou 3^e jour de fièvre, permettent de poser le diagnostic de cowdriose. De plus, la confirmation peut être obtenue par isolement *in vitro* sur cellules endothéliales à partir du plasma des animaux inoculés.

2. Méthodes moléculaires

a) Détection d'*Ehrlichia ruminantium* par sonde ADN

Un fragment de génome spécifique d'*E. ruminantium*, pCS20, a été cloné et utilisé comme sonde nucléique (24, 50). Il reconnaît toutes les souches d'*E. ruminantium* testées jusqu'à présent. Cette sonde, nommée pCS20, détecte facilement l'infection chez les animaux cliniquement réagissant et chez les tiques *Amblyomma* expérimentalement infectées (18, 20, 24, 51). Cependant, elle n'est pas suffisamment sensible pour détecter la plupart des animaux porteurs ou les faibles taux d'infection des tiques (35, 36). La sonde pCS20 est plus sensible que les sondes 16S et MAP1 (*Major Antigenic Protein 1*) pour la détection d'*E. ruminantium* dans les tiques quand elle est hybridée sur un produit d'amplification homologue obtenu par PCR (2).

b) Détection d'*Ehrlichia ruminantium* par PCR et PCR nichée

Deux amorces – AB128 (5'-ACT-AGT-AGA-AAT-TGC-ACA-ATC-TAT-3') et AB129 (5'-TGA-TAA-CTT-GGT-GCG-GGA-AAT-CCT-T-3') – ont été dérivées à partir de la séquence nucléotidique de la sonde pCS20 (24) pour être utilisées dans une réaction de PCR. Ces sondes amplifient un fragment de 279 pb qui est spécifique d'*E. ruminantium*. L'hybridation de la sonde pCS20 marquée sur les produits d'amplification au cours d'une étape supplémentaire a permis d'augmenter la sensibilité : cette technique est 350 fois plus sensible que l'utilisation de la sonde ADN seule pour détecter *E. ruminantium* directement sur l'ADN extrait de tiques. Les faibles niveaux d'infection chez les animaux et les tiques nourries sur animaux porteurs peuvent être détectées par PCR, alors que l'hybridation avec la sonde pCS20 seule (sans PCR préalable) reste généralement négative (37). La limite de détection par PCR conventionnelle a été déterminée expérimentalement entre 10 et 100 organismes alors qu'elle est de 1 à 10 organismes par PCR-hybridation. La PCR-hybridation a permis de détecter 37 souches de toutes les zones d'enzootie testées avec une spécificité de 98 %. La sensibilité de la PCR est variable, comprise entre 88 % et 97 % avec des échantillons de tiques contenant 10⁷ à 10⁴ organismes, et chutant à 61 % et 28 % avec des échantillons contenant respectivement 10³ et 10² organismes (35). En conséquence, le taux de 86 % de tiques positives gorgées sur un animal en réaction clinique, chute à 21 % quand elles sont gorgées sur des animaux porteurs car la rickettsiémie est inférieure chez ces animaux. La PCR-hybridation a été largement utilisée pour étudier l'épidémiologie de la cowdriose en Afrique australe.

Deux épreuves de PCR nichées ont été mises au point pour améliorer la détection des faibles rickettsémies et pour supprimer l'étape d'hybridation (30, 43). Ces deux épreuves ciblent la séquence pCS20. L'épreuve de Semu *et al.* utilise deux amorces externes U24 (5'-TTT-CCC-TAT-GAT-ACA-GAA-GGT-AAC-3') et L24 (5'-AAA-GCA-AGG-ATT-GTG-ATC-TGG-ACC-3'), puis les amorces AB 128 et AB 129 pour la réaction nichée. La sensibilité de cette épreuve est de 1 copie du gène du fragment pCS20 ou d'1 organisme. L'autre PCR nichée utilise une paire d'amorces externes qui comprend l'amorce AB128 et l'amorce anti-sens

AB130. Elles amplifient un fragment de 413 pb utilisé comme matrice dans un second cycle de PCR réalisé avec les amorces internes AB128 et AB129. L'utilisation des amorces AB128 et AB129 évite la nécessité de réévaluer totalement la spécificité de l'épreuve. La PCR nichée montre une amélioration de sensibilité de 100 fois en comparaison avec la PCR simple, et une limite de détection d'environ 6 organismes. La conséquence directe est l'augmentation de 1,7 % à 36 % du taux de tiques sauvages trouvées positives dans une enquête épidémiologique réalisée dans les Caraïbes. La limite de détection est comparable à celle de la méthode de PCR/hybridation qui est beaucoup plus complexe et longue à mettre en œuvre. La PCR nichée pCS20 permet une détection fiable d'*E. ruminantium* à partir des tiques, du sang, du cerveau et des poumons d'animaux infectés, que les prélèvements soient traités frais, après congélation ou conservation dans l'éthanol à 70 %. Une des contraintes de la PCR nichée est le très grand soin qu'il convient d'apporter pour éviter les contaminations dues à l'ouverture répétée des tubes contenant la première réaction de PCR lors de la réalisation de l'étape PCR nichée.

Une PCR nichée ciblant le gène polymorphe complet *map1* a été développée en parallèle afin de typer les souches par polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) ou séquençage du produit d'amplification directement à partir des échantillons pathologiques détectés positifs par la PCR nichée pCS20 (30). Une autre PCR nichée qui cible le gène polymorphe *map1* peut être utilisée pour typer les souches de cowdriose qui circulent, en vue de la formulation des vaccins et de la gestion de la maladie. Les produits d'amplification de la PCR sont analysés par polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou par séquençage. La forte diversité génétique d'*E. ruminantium* observée sur le terrain peut influencer la formulation des vaccins et nécessite davantage d'investigations. La PCR nichée *map1* a une sensibilité légèrement inférieure à celle de la PCR nichée pCS20. La limite de détection est estimée à environ 60 organismes et seulement 91 % des échantillons positifs par PCR nichée pCS20 sont également révélés positifs par la PCR nichée *map1*, certains positifs de faible intensité avec la PCR nichée pCS20 restant négatifs avec la PCR nichée *map1*.

Les amorces 32F1 et 32R1 dérivées de la séquence du gène *map1* d'*E. ruminantium*, de même qu'une autre paire d'amorces ayant pour cibles les gènes *map1*, *map2*, *gltA* et *16SADNr* d'*E. ruminantium* ont été utilisées pour détecter l'agent pathogène chez les tiques, le sang et la moelle osseuse de moutons porteurs et d'ongulés sauvages africains, mais ces techniques n'ont pas été évaluées ou utilisées à grande échelle.

Bien que les méthodes de PCR se montrent très efficaces pour la détection de l'infection chez les tiques ou dans des échantillons d'animaux pendant la phase clinique de la maladie ou après la mort, les études restent limitées pour évaluer leur valeur chez les ruminants porteurs. La présence d'*E. ruminantium* peut aisément être démontrée dans le sang d'animaux infectés juste avant l'augmentation de la réaction fébrile et pendant quelques jours après guérison (24, 43). Après cette période, sa détection est sporadique et semble dépendre du niveau de rickettsémie. Dans une étude conduite au Zimbabwe, seulement 3,3 % et 26,7 % des bovins et 23,3 % des chèvres ont été trouvées positives alors que les données collectées à partir des tiques provenant de la même région suggèrent que, vu leur âge, tous les bovins et toutes les chèvres auraient dû être exposés ou infectés (19). Une étude comparative de l'ELISA MAP1 et de l'épreuve PCR/hybridation pCS20, en vue d'évaluer leur sensibilité respective sur une période de 8 semaines (tests réalisés tous les 15 jours), a été conduite sur 15 bovins localisés dans une ferme du Zimbabwe dans laquelle la cowdriose était enzootique, la lutte anti-tiques réduite au minimum et avec une pression d'infection élevée (44). Dans cette ferme, le taux d'infection des tiques par *E. ruminantium* était de 10 % à 12 %. Les données ont démontré que la PCR pCS20 était plus fiable pour détecter l'infection à partir du sang des bovins que la recherche des anticorps par l'ELISA MAP1 indirect. Les bovins n'ont pas été trouvés positifs en PCR ou en ELISA à chaque fois et certains bovins sont restés négatifs en PCR tout au long de l'étude. Ces résultats suggèrent que les niveaux de rickettsémie varient et que la PCR ne détecte l'infection que lorsque les niveaux sont élevés. La détection des animaux guéris/porteurs est moins fiable que la détection des animaux cliniquement infectés. Ceci souligne le fait que pour la détermination de l'infection chez les animaux avec une maladie sub-clinique, il est conseillé de répéter l'épreuve de PCR pCS20. On ne sait pas si l'absence de détection chez la plupart des animaux porteurs est due à une sensibilité insuffisante des méthodes de PCR pour détecter une rickettsémie très basse, ou à un relargage intermittent des organismes dans la circulation. Une technique pratique de confirmation du statut d'animal porteur dont le sang est négatif en PCR, est de gorger des lots de tiques vierges sur l'animal et de tester les tiques par une PCR semi-nichée pCS20. On ne sait pas si les tiques agissent simplement en concentrant les organismes circulants, en amplifiant leur nombre, ou même en induisant le relargage des micro-organismes dans la circulation pendant le repas.

c) Détection d'*Ehrlichia ruminantium* par la technique de reverse line blot

La technique de reverse line blot (RLB) a été utilisée pour la détection simultanée d'*Anaplasma* et *Ehrlichia* spp. connues chez les ruminants sur la base des différences du gène codant la petite sous-unité de l'ARNr (3). Les amorces 16S8FE et B-GA1B-new ont été dérivées à partir des domaines conservés et utilisées pour amplifier un fragment de 492-498 pb du gène de l'ARNr 16S encadrant la région variable V1. Des sondes oligonucléotidiques spécifiques ont été dérivées dans la boucle V1 afin de permettre la détection spécifique d'*E. ruminantium*, *E. ovina*, *E. sp.* souche Omatjenne, *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. ovis* et *A. phagocytophilum*. Une sonde oligonucléotidique réagissant avec toutes

les espèces (catch-all probe) a aussi été dérivée pour servir de témoin dans le cas où un produit de PCR n'hybriderait avec aucune sonde spécifique d'espèce. Dans la méthode, les sondes spécifiques d'espèces sont liées de façon covalente à la membrane d'hybridation qui est hybridée avec un produit de PCR obtenu avec les amorces 16S8FE et B-GA1B-new. Les produits de PCR obtenus avec tous les micro-organismes mentionnés ci-dessus ont montré un accrochage seulement avec les sondes oligonucléotidiques spécifiques. Aucun produit de PCR n'a été détecté et aucune hybridation n'est intervenue quand la PCR-RLB a été appliquée à *Theileria annulata*, *Babesia bigemina* ou à l'ADN de mammifères. De façon similaire, les tiques servant de témoin négatif se sont toujours avérées négatives en RLB alors qu'il a été possible de détecter l'infection par *E. ruminantium* dans 15 à 70 % de tiques nourries sur des moutons infectés expérimentalement ou porteurs asymptomatiques. Au Mozambique, *E. ruminantium* a aussi pu être détecté dans le sang de 12 petits ruminants sentinelles placés sur le terrain avec les animaux infectés ; une infection mixte a été détectée chez 5 des animaux sentinelles infectés, démontrant ainsi l'utilité de la méthode pour détecter les infections multiples. Cependant, la sensibilité de la méthode n'a pas été déterminée et une validation par des enquêtes épidémiologiques à large échelle est nécessaire.

d) Détection d'*Ehrlichia ruminantium* par PCR en temps réel

Deux épreuves de PCR en temps réel (QPCR) ont été décrites pour la détection et la quantification d'*E. ruminantium*. Dans un premier test, un fragment de 182 pb dérivé du gène non-polymorphe *map1-1* a été amplifié et la détection a été réalisée en utilisant la méthode SYBR de Green (41). L'ADN de 6 isolats différents a été amplifié avec succès. La limite de détection rapportée est supérieure à 0,1 organisme/μl, mais ce résultat n'a pas fait l'objet d'une investigation approfondie. Le comptage d'*E. ruminantium* au microscope après coloration par la méthode de Giemsa ne donne pas des résultats précis. L'épreuve n'améliore pas de façon significative la sensibilité de détection de la PCR nichée, bien qu'elle permette la quantification d'*E. ruminantium*. Non seulement la QPCR n'a subi qu'une validation limitée, mais en outre elle n'a été utilisée qu'une seule fois au cours d'une étude visant à suivre la cinétique d'*E. ruminantium* dans le sang de moutons expérimentalement infectés. *E. ruminantium* a été détectée seulement pendant la période d'hyperthermie. Comparée aux PCR non-quantitative, la QPCR n'améliore donc pas la détection des porteurs asymptomatiques.

Une deuxième PCR en temps réel (basée sur la méthode SYBR de Green) a été décrite et largement validée pour la caractérisation de la cinétique de multiplication et de relargage d'*E. ruminantium* dans des cultures de cellules endothéliales et pour son utilisation éventuelle au cours de la production en masse d'*E. ruminantium* en bio-réacteurs (40). Le produit est un fragment de 873 pb du gène *map1*. Le référent externe pour la quantification d'*E. ruminantium* est un néo-plasmide qui contient une copie de la séquence cible de *map1*, ce qui donne une technique plus précise pour quantifier les organismes que la méthode précédemment décrite dans laquelle le comptage d'*E. ruminantium* est fait au microscope. Le spectre quantitatif de la dynamique permet des mesures exactes dans des échantillons contenant entre 10^2 et 10^8 copies du gène. La méthode a été appliquée avec succès à 4 isolats différents mais n'a pas été validée sur des échantillons à des fins diagnostiques.

• Lecture des résultats

Comme *E. ruminantium* est une bactérie intracellulaire qui ne peut être cultivée en milieu acellulaire et que son isolement est difficile et prend plusieurs semaines, les techniques de détection moléculaires sont les plus appropriées pour le diagnostic de cowdriose. La PCR apparaît comme la plus simple à mettre en œuvre et plus sensible que les sondes ADN. Avec toutes les PCR cependant, il est nécessaire de s'assurer de l'absence de toute contamination croisée entre les échantillons. Des témoins positifs et négatifs doivent être inclus lors de chaque épreuve. Comme la sérologie de la cowdriose a de nombreuses limites (cf. Section B.3.), la PCR pourrait être utilisée pour confirmer si des animaux séronégatifs originaires de zones d'enzootie ne sont pas infectés avant leur déplacement vers une zone indemne qui pourrait devenir infectée en cas de présence de vecteurs potentiels. Cependant, malgré des résultats expérimentaux intéressants pour la détection de porteurs asymptomatiques, il n'y a pas suffisamment d'informations disponibles sur la fiabilité de la détection par PCR des porteurs, et des études de terrain complémentaires doivent être conduites avant de recommander le meilleur protocole pour la détection des animaux porteurs. Il est néanmoins évident au vu de l'étude menée au Zimbabwe que la détection des porteurs sera difficile et qu'il faudra de nombreux essais répétés pour évaluer le statut infectieux (44). Les résultats actuels obtenus par la PCR, la PCR nichée, l'épreuve RLB et plus récemment la QPCR, montrent que la détection d'*E. ruminantium* dans le sang est fiable seulement pendant et autour de la phase fébrile de la maladie. Les méthodes basées sur la PCR apparaissent comme les plus fiables pour détecter l'infection chez les tiques, et cela peut avoir une valeur épidémiologique pour la détermination de la distribution géographique d'*E. ruminantium*. De plus, si nécessaire dans les zones d'enzootie, le test de tiques (à l'origine non infectées) nourries sur animaux suspects augmenterait grandement la sensibilité de la détection des porteurs quand la sérologie ou la PCR sur le sang se sont avérées négatives. Le procédé n'est cependant pas pratique pour un diagnostic de routine car il nécessite l'entretien d'une colonie de tiques et une capacité d'expérimentation sur animaux.

3. Épreuves sérologiques

Plusieurs épreuves sérologiques ont été décrites pour le diagnostic de cowdriose : une épreuve d'IFI utilisant une culture d'*E. ruminantium* en cellules endothéliales comme antigène (CIFA test), un ELISA indirect, un ELISA de compétition (C-ELISA), et un Western blot. L'épreuve d'IFI utilisant les macrophages péritonéaux de souris infectées par *E. ruminantium* (MIFA test) n'est plus utilisée (10).

La principale faiblesse de toutes ces épreuves est la révélation de réactions faussement positives dues à des déterminants antigéniques communs présents sur la protéine MAP1 d'*E. ruminantium* (11) et des protéines homologues de plusieurs autres espèces d'*Ehrlichia* (23, 43). Ces épreuves ne sont quasiment plus utilisées en épidémiologie ou pour le diagnostic. L'épreuve CIFA est encore utilisée dans certains laboratoires, mais les résultats doivent être interprétés en tenant compte des réactions faussement positives.

Pour pallier le problème des réactions croisées avec *Ehrlichia*, deux ELISA basés sur un antigène recombiné MAP1 ont été mis au point. Le premier est un ELISA indirect basé sur la région immunogénique de la protéine MAP1 (appelé MAP1-B) qui donne beaucoup moins de réactions croisées avec des espèces d'*Ehrlichia* (MAP1-B ELISA) (49). Le second est un ELISA de compétition qui utilise le gène *map1* cloné dans le baculovirus et des anticorps monoclonaux (AcMs) produits contre la protéine MAP1 (MAP1 C-ELISA) (12). Les deux épreuves ont considérablement amélioré la spécificité de la détection, mais elles montrent encore une certaine réactivité avec des sérums à haut titre contre *E. canis*, *E. chaffeensis* et un agent microbien du cerf de Virginie non encore classé. Le MAP1-B ELISA détecte les anticorps dirigés contre *E. muris* (Mahan S.M., communication personnelle) une *Ehrlichia* qui est apparentée et très proche d'*E. ruminantium* ; cet agent pathogène est retrouvé chez le cerf de Virginie en Géorgie aux États-Unis et est transmis par les tiques *Amblyomma americanum* (15). La sérologie comme outil de diagnostic chez un animal exposé à *E. ruminantium* n'est donc pas fiable. La sérologie ne doit être utilisée qu'au niveau du troupeau en prenant en compte le contexte épidémiologique et, si nécessaire, en la complétant par des techniques moléculaires.

Jusqu'à présent, l'ELISA MAP1-B est celui qui a été le plus largement utilisé.

a) Épreuve d'immunofluorescence indirecte utilisant les cultures de cellules endothéliales comme antigène (29)

Pour préparer l'antigène, une souche d'*E. ruminantium* est cultivée dans des cellules endothéliales de ruminant. Quand la plupart des cellules sont lysées, les cellules adhérentes restantes sont raclées et mélangées au surnageant. Les cellules sont centrifugées 3 fois dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) à 200 g pendant 10 min. 10 µl de la suspension cellulaire lavée sont déposés dans les puits d'une lame pour immunofluorescence. Les lames d'antigène sont séchées, fixées à l'acétone et conservées à -20 °C.

• Protocole

- i) Les sérums à éprouver sont dilués au 1/20 ou à une dilution supérieure dans du PBS, déposés dans les puits d'antigène et mis à incuber pendant 30 min dans une chambre humide à 37 °C.
- ii) Les lames sont lavées dans du PBS pendant 15 min.
- iii) Le conjugué anti-espèce approprié, généralement dilué au 1/60, est ajouté pour recouvrir les puits. Les lames sont incubées de nouveau pendant 30 min à 37 °C.
- iv) Après un second lavage, les lames sont montées dans du tampon à la glycérine sous une lamelle et examinées avec un microscope à fluorescence.
- v) Des témoins positifs et négatifs sont inclus sur chaque lame.

b) L'épreuve immuno-enzymatique MAP1-B (43, 49)

Le fragment d'amplification par PCR MAP1-F2R2 cloné dans le vecteur pQE9 qui code les acides aminés 47 à 152 de la protéine MAP1 incluant la région immunogène MAP1-B est exprimé dans *Escherichia coli* M15[pREP4] en protéine de fusion contenant 6 résidus histidine. La protéine recombinée MAP1-B est purifiée sur agarose Ni²⁺-NTA (*Nitrilotriacetic Acid Agarose*) en conditions dénaturantes selon le protocole fourni par le fabricant. L'antigène est conservé à 4 °C et chaque lot est titré.

L'antigène est dilué à 0,5 µg/ml dans du tampon carbonate de sodium 0,05 M, pH 9,6, adsorbé sur plaque de polystyrène par incubation pendant 1 h à 37 °C, et conservé à 4 °C jusqu'à utilisation. Cependant, dans un essai préalable, la concentration de l'antigène à 2 µg/ml réduisait le bruit de fond et améliorait la spécificité (données non présentées, 43).

- **Protocole**

- Les plaques sont bloquées pendant 30 min par addition de 100 µl par puits de PBS 0,1 M, pH 7,2, additionné de 0,1 % de Tween 20 et de 3 % de lait écrémé en poudre (PBSTL).
- Les plaques sont lavées 3 fois dans du PBS additionné de 0,1 % de Tween 20 (PBST) et 2 fois en eau distillée.
- 100 µl de sérum à tester dilué au 1/100 en PBSTL sont distribués en double dans les puits et incubés pendant 1 h à 37 °C.
- Les plaques sont lavées 3 fois dans du PBST et 2 fois en eau distillée.
- Le conjugué peroxydase IgG anti-espèce dilué de façon optimale dans du PBSTL est distribué sous un volume de 100 µl par puits et les plaques sont incubées pendant 1 h à 37 °C.
- Après un lavage identique à celui de l'étape iv, chaque puits est rempli de 100 µl de tampon citrate 0,1 M, pH 5,5, contenant 0,5 mg/ml d'orthophénylène-diamine et 3 µl/ml de H₂O₂ à 9 %.
- La réaction est stoppée après 30 min d'incubation à température ambiante (20 - 25 °C) par addition de 50 µl de H₂SO₄ 2N. L'absorbance est lue à 495 nm. Des témoins positifs et négatifs sont inclus dans chaque plaque.

c) **L'épreuve immuno-enzymatique MAP1 de compétition (32)**

L'antigène recombiné MAP1 est préparé comme suit : des larves de l'insecte *Trichoplusia ni* âgées de 8 jours sont infectées par du baculovirus exprimant le gène *map1* et les larves mourantes sont homogénéisées (10 % [P/v]) dans du PBS additionné de 0,001 % (v/v) de Triton X-100.

L'anticorps monoclonal anti-MAP1 est préparé comme suit : des cellules spléniques de souris BALB/C préalablement inoculées avec de l'homogénat de larves sont fusionnées avec des cellules SP2/0. Les surnageants de culture d'hybridomes sont criblés pour leur réactivité avec MAP1 par immunoblotting et immunoperoxydase. Une culture positive est sous-clonée, l'isotype de l'anticorps déterminé et utilisé ensuite pour la production d'ascite.

Après une dilution au 1/800 (v/v) dans du PBS, l'antigène est adsorbé sur des plaques de polystyrène (Nunc-Immuno Plates PolySorp) par incubation à 4 °C pendant une nuit et les plaques sont conservées à -70 °C.

- **Protocole**

- Avant usage, Les plaques sont bloquées pendant 30 min par addition de 100 µl par puits de 0,1 M de PBS, pH 7,2, additionné de 0,05 % de Tween 20 et de 5 % de lait écrémé en poudre.
- Les plaques sont lavées 3 fois dans du PBS/Tween, 50 µl/puits de sérum à tester dilué au 1/50 dans du PBS additionné de 0,05 % Tween 20 et de 1 % de lait écrémé en poudre (PBSTL) sont distribués en double dans les puits et incubés pendant 30 min à 37 °C.
- Sans lavage supplémentaire, 75 µl/puits d'AcMs dilué au 1/4 000 (v/v) dans du PBSTL sont distribués et la plaque est mise à incuber pendant 30 min à 37 °C.
- Les plaques sont lavées 3 fois dans du PBS/Tween et le conjugué peroxydase IgG anti-souris dilué de façon optimale dans du PBSTL est distribué sous un volume de 50 µl par puits. La plaque est incubée pendant 1 h à 37 °C.
- Après 3 lavages identiques à ceux de l'étape précédente, chaque puits est rempli de 100 µl de tampon citrate 0,1 M, pH 5,5, contenant 0,5 mg/ml d'orthophénylène-diamine et 3 µl/ml de H₂O₂ à 9 %. Après 30 min d'incubation à température ambiante à l'obscurité, la réaction est stoppée par addition de H₂SO₄ 2 N et l'absorbance est lue à 495 nm. Des témoins positifs et négatifs sont inclus dans chaque plaque.

- **Lecture des résultats**

Toutes les épreuves sérologiques basées sur des antigènes d'*E. ruminantium* non recombinés tels que le CIFA, les ELISA et les Western blot sont encore utilisées pour des études expérimentales, mais plus pour les études épidémiologiques. Les épreuves ont été comparées et évaluées avec des sérums positifs et négatifs vis-à-vis d'*E. ruminantium* (9). Aucun sérum négatif ne s'est révélé faussement positif avec aucune des épreuves. Il y a une bonne corrélation entre les épreuves mais la spécificité des 5 épreuves est réduite à cause de réactions croisées pouvant survenir avec certaines *Ehrlichia* spp.

L'interprétation des résultats des diverses épreuves utilisées pour des études de terrain est de ce fait difficile dans les zones où existent des infections de ruminants à *E. ruminantium*, ce qui est probablement le cas dans la plupart des régions d'enzootie en Afrique. Cette situation a aussi été démontrée dans des fermes sans *Amblyomma*, mais infectées par des espèces de tiques non reconnues comme vecteurs d'*E. ruminantium* (13, 49).

Aussi bien l'ELISA MAP1-B que le C-ELISA MAP1 ont montré une spécificité élevée après évaluation sur 3 000 sérums de ruminants (chèvres, moutons, bovins) prélevés dans 14 îles des petites Antilles infestées par *A. variegatum*, parmi lesquelles seulement 3 sont connues pour être également infectées par *E. ruminantium* (32). La spécificité globale calculée à partir des 11 îles indemnes de cowdriose est de 98,5 % et 99,4 % respectivement pour les C-ELISA MAP1 et l'ELISA MAP1. Bien que quelques sérums faussement positifs soient encore trouvés, ces épreuves semblent à même de résoudre la plupart des problèmes de spécificité rencontrés avec les épreuves plus anciennes. Cependant, une prévalence élevée a été trouvée avec le test dans des régions indemnes de vecteur du Zimbabwe et d'Afrique du Sud sans que cela puisse être expliqué (cela pourrait être dû à un agent présentant des réactions croisées, mais qui ne serait pas transmis par *Amblyomma*) ; il convient de garder cet exemple en mémoire lors de l'interprétation des résultats.

Évaluer la sensibilité des épreuves est plus problématique car elle requiert la connaissance du statut exact d'un grand nombre d'animaux échantillonnés sur le terrain. Comme indiqué précédemment il n'y a pas actuellement de technique simple disponible pour confirmer si un animal est infecté. Expérimentalement, la sensibilité du C-ELISA chez les chèvres a été évaluée à 91,6-95,4 % pour l'ELISA MAP1-B, et 96,3 à 96,9 % pour le C-ELISA (32). Cependant dans une autre étude, la sensibilité avoisinait 95 % pour des seuils fixés à 31 % et 26,6 % du sérum témoin positif respectivement pour les moutons et les chèvres (31). Les calculs sont basés sur un nombre limité d'animaux infectés expérimentalement et testés pendant une période proche de l'inoculation quand tous les animaux sont encore positifs. La sensibilité est inférieure chez les bovins et plusieurs études rapportent qu'après infection la plupart des animaux redeviennent séronégatifs en moins de 6 mois et que quelques animaux ne séroconvertissent jamais (21, 43). Cette observation est en accord avec les différences de séroprévalence observées entre les petits ruminants et les bovins dans les enquêtes épidémiologiques qui ne peuvent être expliquées par un risque plus faible d'infection chez ces derniers. Par exemple, dans des fermes du Zimbabwe situées dans les régions d'enzootie, plus de 90 % des chèvres présentaient des anticorps dans leur sérum comparé à 33 % seulement des bovins dans les mêmes conditions (21). Des observations semblables ont été faites dans les Caraïbes. En outre, dans certaines régions du Zimbabwe considérées comme indemnes de cowdriose, un grand nombre de chèvres ont été trouvées positives avec le MAP1-B ELISA : cette observation complique encore plus le diagnostic sérologique de la cowdriose (13).

Les épreuves sérologiques sont utiles pour l'évaluation de la réponse humorale vis-à-vis de la cowdriose chez les animaux vaccinés. Les épreuves ne devraient pas être utilisées pour cribler les animaux avant l'importation dans des régions indemnes de cowdriose. En effet, les anticorps se maintiennent à des niveaux détectables chez les animaux infectés naturellement seulement pendant quelques mois et que les anticorps circulants disparaissent plus rapidement chez les bovins que chez les petits ruminants. Il est ainsi possible que des animaux séronégatifs soient porteurs de l'infection. La sérologie doit donc être considérée seulement comme une méthode de diagnostic à appliquer au niveau du troupeau, mais pas au niveau individuel (38). Lors de l'interprétation des résultats de la sérologie, d'autres paramètres notamment épidémiologiques doivent être pris en compte.

Les méthodes moléculaires telles que la PCR, peuvent potentiellement aider à la détection des animaux porteurs, mais cette approche possède encore des inconvénients significatifs (cf. Section B.2, méthodes moléculaires).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Aucun vaccin n'est commercialement disponible actuellement. La seule méthode d'immunisation contre la cowdriose reste « l'infection et le traitement » basée sur l'utilisation de sang infecté ou d'homogénat de nymphes de tiques suivie par le traitement aux tétracyclines des animaux réagissant (4). Cette méthode est encore utilisée dans plusieurs régions, mais il est probable qu'elle sera remplacée rapidement par une préparation à base d'organismes atténués ou inactivés qui ont donné des résultats prometteurs.

1. Préparation vaccinale à base d'organismes inactivés

Suite à la démonstration que des chèvres sensibles peuvent être protégées par des *E. ruminantium* inactivées dans de l'adjuvant de Freund's (27), il a été démontré que la vaccination à base de corps élémentaires inactivés

d'*E. ruminantium* émulsifiés dans un adjuvant huileux était également possible. Ce vaccin protège également les moutons contre une épreuve virulente (16) par différentes souches d'*E. ruminantium* (17), et les bovins (47) par la même souche que celle utilisée chez les chèvres. Un vaccin de première génération constitué d'*Ehrlichia* inactivées dans de l'adjuvant Montanide ISA50 a démontré une efficacité identique chez la chèvre et le mouton à celle d'une préparation effectuée avec de l'adjuvant de Freund's (28).

Au cours d'essais préalables, les animaux ont été immunisés par deux injections sous-cutanées de 250 à 1 000 µg (selon l'essai) d'antigène émulsifié (50/50) dans de l'adjuvant Montanide ISA50 dans un volume de 2 ml. Récemment, il a été démontré expérimentalement que la dose d'antigène peut être réduite chez des chèvres à 35 µg sans altérer l'effet protecteur (48). Cela représente une division par 28 de la dose proposée dans les descriptions initiales, de 1 g à 35 µg d'*E. ruminantium* sans baisse de la protection. Parallèlement, le protocole de production de masse d'*E. ruminantium* a été mis au point (25). Les paramètres critiques de la production d'*E. ruminantium* sur cellules endothéliales dans des bio-réacteurs avec agitation ont été répertoriés et optimisés. Dans de tels bio-réacteurs et avec du milieu dépourvu de sérum, la production d'*E. ruminantium* est multipliée par 6,5, comparée à la production par des méthodes conventionnelles. En utilisant un bio-réacteur de 2 litres et une dose vaccinale de 30 µg, le coût estimé pour une dose de vaccin est de 0,11 €, ce qui rend le vaccin abordable dans les pays aux ressources limitées. Des contrôles d'activité ont été menés sur des préparations vaccinales entièrement produites selon les protocoles de production de masse et de purification décrits et conservées dans diverses solutions (solution saline ou PBS) et à diverses températures (–20 °C ou +4 °C) ; ces contrôles ont montré que l'activité du vaccin est conservée au cours des procédures de production de masse et de conservation (26).

L'évaluation d'un vaccin inactivé adjuvé avec de l'ISA50 a démontré sa capacité à protéger des moutons contre une épreuve naturelle sur le terrain au Zimbabwe (17). Des essais d'évaluation réalisés en grandeur nature sur le terrain menés en Afrique de l'Est et en Afrique du Sud, utilisant soit une souche prototype isolée au Zimbabwe (souche Mbizi) soit une souche locale isolée des sites d'expérience, ont mis en évidence une réduction significative de la mortalité chez les bovins, les chèvres et les moutons (22). Cependant, dans 3 sites sur 4, le vaccin préparé avec la souche locale s'est révélé moins efficace que le vaccin préparé avec la souche Mbizi, ce qui suggère une mauvaise adéquation vis-à-vis du répertoire antigénique des isolats présents dans chaque site. L'absence de protection croisée entre les isolats d'*E. ruminantium*, du fait de la diversité de la composition antigénique, est bien connue, mais la complexité des populations d'*E. ruminantium* rencontrées sur le terrain a été sous-estimée. Il a été également démontré au cours d'essais en grandeur nature dans divers systèmes d'élevage en Afrique de l'Ouest, dans des zones géographiques limitées, que plus de 10 génotypes étaient présents avec des réactions de protection croisées différentes ; ce qui n'est pas sans conséquence pour la protection obtenue avec des préparations vaccinales inactivées (résultat non publiés).

Le vaccin avec la souche Mbizi inactivée est en cours de mise au point en vue de sa commercialisation à l'Onderstepoort Biological Products en Afrique du Sud (Mahan S.M., communication personnelle). Ces vaccins inactivés n'empêchent pas l'infection mais réduisent la mortalité chez les animaux vaccinés lorsqu'ils sont exposés à une épreuve virulente. Néanmoins, un avantage réside dans le fait que plusieurs souches de terrain peuvent être incorporées dans la préparation vaccinale afin d'augmenter la protection croisée.

Le défi majeur reste la caractérisation de l'étendue de la diversité des souches dans une région qui doit être couverte par une formulation vaccinale adéquate. Cette connaissance sera également essentielle pour toute nouvelle génération de vaccins développés dans le futur.

2. Préparation vaccinale à base d'organismes atténués

L'infection des ruminants par des souches vivantes d'*E. ruminantium* induit une solide immunité de longue durée contre les souches homologues. Cette constatation est la base de la méthode « infection-traitement » avec des isolats virulents. L'utilisation d'isolats de virulence atténuée ne nécessitant pas de traitement serait l'idéal, mais peu d'isolats de ce genre sont actuellement disponibles. Un isolat Sénégal atténué a pu être obtenu ; il a conféré une protection de 100 % vis-à-vis d'une épreuve virulente mortelle avec une souche homologue, mais une faible protection vis-à-vis d'une épreuve virulente hétérologue. L'isolat Gardel qui présente un niveau de protection croisée élevé (mais pas total) vis-à-vis d'autres isolats a aussi été atténué. Récemment, un 3^e isolat d'Afrique du Sud, Welgevonden, a été atténué et offre, dans des conditions expérimentales, une protection complète vis-à-vis de 4 isolats hétérologues (46). L'inconvénient majeur des vaccins atténués réside dans leur très grande fragilité qui entraîne l'obligation de leur conservation dans l'azote liquide et leur distribution sous congélation. En outre, il faut les administrer par voie intraveineuse.

3. Préparations avec des vaccins recombinés

Une protection partielle des souris par une vaccination utilisant l'ADN du gène *map1* a été signalée à plusieurs reprises, et une amélioration de la protection a été obtenue grâce à un protocole associant une première injection (plasmide) suivie d'un rappel (MAP1 recombiné) (33). Cependant, aucune protection chez les ruminants n'a été

mise en évidence avec cette stratégie. En revanche, une protection significative chez le mouton a été signalée contre des épreuves virulentes homologues et hétérologues après vaccination avec des plasmides utilisant un cocktail de 4 cadres de lecture (ORF = *open reading frames*) du locus 1H12 du génome d'*E. ruminantium* (7). Aucun résultat supplémentaire n'a été publié depuis. Il est probable que les vaccins recombinés ne seront pas disponibles dans un avenir proche.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALLSOPP M.T.E.P. & ALLSOPP B.A. (2001). Novel *Ehrlichia* genotype detected in dogs in South Africa. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 4204–4207.
2. ALLSOPP M.T.E.P., HATTINGH C.M., VOGEL S.W. & ALLSOPP B.A. (1999). Evaluation of 16S, *map1* and pCS20 probes for detection of *Cowdria* and *Ehrlichia* species. *Epidemiol. Infect.*, **122**, 323–328.
3. BEKKER C.P., DE VOS S., TAOUFIK A., SPARAGANO O.A. & JONGEJAN F. (2002). Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. *Vet. Microbiol.*, **89**, 223–238.
4. BEZUIDENHOUT J.D., PROZESKY L., DU PLESSIS J.L. & VAN AMSTEL S.R. (1994). Chapter 35: Heartwater. In: Infectious Diseases of Livestock, with special reference to Southern Africa, Coetzer J.A.W., Thomson G.R., Tustin R.C. & Kriek N.P.J., eds. Oxford University Press, Oxford, UK, Vol. 1, 351–370.
5. CAMUS E. & BARRE N. (1988). Le diagnostic de la cowdriose à partir d'écrasement de cerveau. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **41**, 247–252.
6. CAMUS E., BARRE N., MARTINEZ D. & UILENBERG G. (1996). Heartwater (cowdriosis). A Review, Second Edition. Office International des Epizooties, Paris, France, pp. 177.
7. COLLINS E.N., PRETORIUS A., VAN KLEEF M., BRAYTON K.A., ZWEYGARTH E. & ALLSOPP B. (2003). Development of improved vaccines for heartwater. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **990**, 474–484.
8. DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P., DASCH G.A., PALMER G.H., RAY S.C., RIKIHISA Y. & RURANGIRWA F.R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 2145–2165.
9. DU PLESSIS J.L., BEZUIDENHOUT J.D., BRETT M.S., CAMUS E., JONGEJAN F., MAHAN S.M. & MARTINEZ D. (1993). The serodiagnosis of heartwater: a comparison of five tests. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **46**, 123–129.
10. DU PLESSIS J.L. & MALAN L. (1987). The application of the indirect fluorescent antibody test in research on heartwater. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **54**, 319–325.
11. JONGEJAN F. & THIELEMANS J.C. (1989). Identification of an immunodominant antigenically conserved 32-kilodalton protein from *Cowdria ruminantium*. *Infect. Immun.*, **57**, 3243–3246.
12. KATZ J.B., DEWALD R., DAWSON J.E., CAMUS E., MARTINEZ D. & MONDRY R. (1997). Development and evaluation of a recombinant antigen, monoclonal antibody-based competitive ELISA for heartwater serodiagnosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 130–135.
13. KOKONO O., HOVE T., GEYSEN D. & MAHAN S. (2003). Detection of antibodies to the *Ehrlichia ruminantium* MAP1-B antigen in goat sera from three communal land areas of Zimbabwe by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **70**, 231–235.
14. LOUW M., ALLSOPP M.T.E.P. & MEYER E.C. (2005). *Ehrlichia ruminantium*, an emerging human pathogen – a further report. *S. Afr. Med. J.*, **95**, 948–950.
15. LOFTIS A.D., REEVES W.K., TROUGHTON D.R., SPURLOCK J.P., MAHAN S.M., LEVIN M.L. & DASCH G. (2006). Transmission of an *Ehrlichia* sp. closely related to *Ehrlichia ruminantium*, the causative agent of heartwater by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) from Georgia, USA. *J. Vector Biol.*, **31**, 213–223.
16. MAHAN S.M., ANDREW H.R., N. TEBELE, BURRIDGE M.J. & BARBET A. (1995). Immunisation of sheep against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. *Res. Vet. Sci.*, **58**, 46–49.

17. MAHAN S.M., KUMBULA D., BURRIDGE M.J. & BARBET A.F. (1998). The inactivated *Cowdria ruminantium* vaccine for heartwater protects against heterologous strains and against laboratory and field tick challenge. *Vaccine*, **16**, 1203–1211.
18. MAHAN S.M., PETER T.F., SEMU S.M., SIMBI B.H., NORVAL R.A. & BARBET A.F. (1995). Laboratory reared *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum* ticks differ in their susceptibility to infection with *Cowdria ruminantium*. *Epidemiol. Infect.*, **115**, 345–353.
19. MAHAN S.M., PETER T.F., SIMBI B.H. & BURRIDGE M.J. (1998). PCR detection of *Cowdria ruminantium* infection in ticks and animals from heartwater-endemic regions of zimbabwe. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **849**, 85–87.
20. MAHAN S.M., PETER T.F., SIMBI B.H., KOCAN K., CAMUS E., BARBET A.F. & BURRIDGE M.J. (2000). Comparison of efficacy of American and African *Amblyomma* ticks as vectors of heartwater (*Cowdria ruminantium*) infection by molecular analyses and transmission trials. *J. Parasitol.*, **86**, 44–49.
21. MAHAN S.M., SEMU S.M., PETER T.F. & JONGEJAN F. (1998). Evaluation of the MAP1-B ELISA for cowdriosis with field sera from livestock in Zimbabwe. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **849**, 259–261.
22. MAHAN S.M., SMITH G.E., KUMBULA D., BURRIDGE M.J. & BARBET A. (2001). Reduction in mortality from heartwater in cattle, sheep and goats exposed to field challenge using an inactivated vaccine. *Vet. Parasitol.*, **97**, 295–308.
23. MAHAN S.M., TEBELE N., MUKWEDEYA D., SEMU S., NYATHI C.B., WASSINK L.A., KELLY P.J., PETER T. & BARBET A.F. (1993). An immunoblotting diagnostic assay for heartwater based on the immunodominant 32-kilodalton protein of *Cowdria ruminantium* detects false positives in field sera. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 2729–2737.
24. MAHAN S.M., WAGHELA S.D., MCGUIRE T.C., RURANGIRWA F.R., WASSINK L.A. & BARBET A.F. (1992). A cloned DNA probe for *Cowdria ruminantium* hybridizes with eight heartwater strains and detects infected sheep. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 981–986.
25. MARCELINO I., SOUSA MARCOS F.Q., VERISSIMO C., CUNHA A.E, CARRONDO M.J.T. & ALVES P. (2006). Process development for the mass production of *Ehrlichia ruminantium*. *Vaccine*, **24**, 1716–1725.
26. MARCELINO I., VACHIÉRY N., AMARAL A.I., ROLDAO A., LEFRANÇOIS T., CARRONDO M.J., ALVES P.M. & MARTINEZ D. (2007). Effect of the purification process and the storage conditions on the efficacy of an inactivated vaccine against heartwater. *Vaccine*, **25**, 4903–4913.
27. MARTINEZ D., MAILLARD J.C., COISNE S., SHEIKBOUDOU C & BENSARD A. (1994). Protection of goats against heartwater acquired by immunisation with inactivated elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **41**, 153–163.
28. MARTINEZ D., PEREZ J.M., SHEIKBOUDOU C., DEBUS A. & BENSARD A. (1996). Comparative efficacy of Freund's and Montanide ISA50 adjuvants for the immunisation of goats against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. *Vet. Parasitol.*, **67**, 175–184.
29. MARTINEZ D., SWINKELS J., CAMUS E. & JONGEJAN F. (1990). Comparaison de trois antigènes pour le sérodiagnostic de la cowdriose par immunofluorescence indirecte. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **43**, 159–166.
30. MARTINEZ D., VACHIERY N., STACHURSKI F., KANDASSAMY Y., RALINIAINA M., APRELON R. & GUEYE A. (2004). Nested-PCR for detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium*. Use in genetic diversity analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1026**, 106–113.
31. MBOLOI M.M., BEKKER C.P.J., KRUITWAGEN C., GREINER M. & JONGEJAN F. (1999). Validation of the indirect MAP1-B Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of experimental *Cowdria ruminantium* infection in small ruminants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 66–72.
32. MONDRY R., MARTINEZ D., CAMUS E., LIEBISCH A., KATZ J.B., DEWALD R., VAN VLIET A.H.M. & JONGEJAN F. (1998). Validation and comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Cowdria ruminantium* infection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **849**, 262–272.
33. NYIKA A., BARBET A.F., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2002). DNA vaccination with map1 gene followed by protein boost augments protection against challenge with *Cowdria ruminantium*, the agent of heartwater. *Vaccine*, **20**, 1215–1225.

34. PERREAU P., MOREL P.C., BARRE N. & DURAND P. (1980). Existence de la cowdriose (heartwater) à *Cowdria ruminantium* chez les ruminants des Antilles françaises (La Guadeloupe) et des Mascareignes (La Réunion et Ile Maurice). *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **33**, 21–22.
35. PETER T.F., BARBET A.F., ALLEMAN A.R., SIMBI B.H., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2000). Detection of the agent of heartwater, *Cowdria ruminantium*, in *Amblyomma* ticks by PCR: validation and application of the assay to field ticks. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1539–1544.
36. PETER T.F., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2002). *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. *Trends Parasitol.*, **18**, 214–218.
37. PETER T.F., DEEM S.L., BARBET A.F., NORVAL R.A.I., SIMBI B.H., KELLY P.J. & MAHAN S.M. (1995). Development and evaluation of PCR assay for detection of low levels of *Cowdria ruminantium* infection in *Amblyomma* ticks not detected by DNA probe. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 166–172.
38. PETER T.F., O'CALLAGHAN C.J., MEDLEY G.F., PERRY B.D., SEMU S.M. & MAHAN S.M. (2001). Population-based evaluation of the *Ehrlichia ruminantium* MAP 1B indirect ELISA. *Exp. Appl. Acarol.*, **25**, 881–897.
39. PIENAAR J.G. (1970). Electron microscopy of *Cowdria (Rickettsia) ruminantium* (Cowdry, 1926) in the endothelial cells of the vertebrate host. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **37**, 67–78.
40. PEIXOTO C.C., MARCELINO I., VACHIERY N., BENSARD A., MARTINEZ D., CARRONDO M.J.T. & ALVES P. (2005). Quantification of *Ehrlichia ruminantium* by real time PCR. *Vet. Microbiol.*, **107**, 273–278.
41. POSTIGO M., BELL-SAKYI L., PAXTON E. & SUMPTION K. (2002). Kinetics of experimental infection of sheep with *Ehrlichia ruminantium* cultivated in ticks and mammalian cell lines. *Exp. Appl. Acarol.*, **28**, 187–193.
42. SCHREUDER B.E.C. (1980). A simple technique for the collection of brain samples for the diagnosis of heartwater. *Trop. Anim. Health Prod.*, **12**, 25–29.
43. SEMU S.M., PETER T.F., MUKWEDEYA D., BARBET A.F., JONGEJAN F. & MAHAN S.M. (2001). Antibody responses to Map 1B and other *Cowdria ruminantium* antigens are down regulated in cattle challenged with tick-transmitted heartwater. *Clin. Diag. Immunol. Lab.*, **8**, 388–396.
44. SIMBI B.H., PETER T.F., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2003). Comparing the detection of exposure to *Ehrlichia ruminantium* infection on a heartwater-endemic farm by the pCS20 polymerase chain reaction assay and an indirect MAP1B enzyme linked immunosorbant assay. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **70**, 231–235.
45. SMITH G.E., ANDERSON E.C., BURRIDGE M.J., PETER T.F. & MAHAN S.M. (1998). Growth of *Cowdria ruminantium* in tissue culture endothelial cell lines from wild African mammals. *J. Wildl. Dis.*, **34**, 297–304.
46. SWEYGARTH E., JOSEMAN A.I., VAN STRIJP M.F., LOPZE-ROBELLAR L., VAN KLEEF M. & ALLSOPP B.A. (2005). An attenuated *Ehrlichia ruminantium* (Welgevonden stock) vaccine protects small ruminants against virulent heartwater challenge. *Vaccine*, **23**, 1695–1702.
47. TOTTE P., MCKEEVER D., MARTINEZ D. & BENSARD D. (1997). Analysis of T-cell responses in cattle immunised against heartwater by vaccination with killed elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Infect. Immun.*, **65**, 236–241.
48. VACHIERY N., LEFRANCOIS T., ESTEVES I., MOLIA S., SHEIKBOUDOU C., KANDASSAMY Y. & MARTINEZ D. (2006). Optimisation of the inactivated vaccine dose against heartwater and in vitro quantification of *Ehrlichia ruminantium* challenge material. *Vaccine*, **24**, 4747–4756.
49. VAN VLIET A.H.M., VAN DER ZEIJST B.A.M., CAMUS E., MAHAN S.M., MARTINEZ D. & JONGEJAN F. (1995). Use of a specific immunogenic region on the *Cowdria ruminantium* MAP1 protein in a serological assay. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2405–2410.
50. WAGHELA S.D., RURANGIRWA F.R., MAHAN S.M., YUNKER C.E., CRAWFORD T.B., BARBET A.F., BURRIDGE M.J. & MCGUIRE T.C. (1991). A cloned DNA probe identifies *Cowdria ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2571–2577.

51. YUNKER C.E., MAHAN S.M., WAGHELA S.D., MCGUIRE T.C., RURANGIRWA F.R., BARBET A.F. & WASSINK L.A. (1993). Detection of *Cowdria ruminantium* by means of a DNA probe, pCS20 in infected bont ticks, *Amblyomma hebraeum*, the major vector of heartwater in southern Africa. *Epidemiol. Infect.*, **110**, 95–104.

*

* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la Cowdriose (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

ENCÉPHALITE JAPONAISE

RÉSUMÉ

Le virus de l'encéphalite japonaise (EJ) est un arbovirus de la famille des Flaviviridae responsable d'encéphalite, principalement chez les chevaux. Il infecte aussi l'homme et cause des avortements chez le porc. Les porcs jouent un rôle d'amplificateur du virus et les oiseaux peuvent être aussi impliqués dans sa diffusion. La maladie a été observée dans une grande partie du continent asiatique et récemment dans la région occidentale du Pacifique

Un diagnostic de certitude de l'EJ chez les chevaux repose sur l'isolement du virus à partir des individus affectés ou malades ou retrouvés morts. Comme le taux d'isolement du virus est habituellement très faible, les constatations cliniques, sérologiques et anatomo-pathologiques sont utiles pour le diagnostic.

Identification de l'agent pathogène : *un prélèvement de cerveau est effectué à partir des chevaux malades ou morts ayant présenté des signes cliniques d'encéphalite pour isoler le virus. Les méthodes d'isolement du virus incluent l'inoculation à des souris et à des cultures cellulaires. Une suspension de matériel cérébral en solution saline tamponnée contenant du sérum de veau (ou de la sérumalbumine bovine) et des antibiotiques est inoculée par voie intracérébrale à des souris âgées de 2 à 4 jours. Si une souris présente des signes nerveux suivis de la mort dans les 14 jours, l'identification du virus peut être ensuite réalisée en culture cellulaire. Le virus peut aussi être isolé en culture de cellules d'embryon de poulet, de reins de hamster ou de porc, de rein de singe vert africain (Vero), de cellules de rein de bovin Madin-Darby (MD-BK) et en lignées cellulaires de moustique.*

Un effet cytopathogène (ECP) apparaît dans quelques cultures de cellules, mais il est habituellement difficile à mettre en évidence. L'identification du virus sur souriceau ou en culture cellulaire est confirmée par des méthodes sérologiques ou de détection de l'acide nucléique telle qu'une réaction de transcription inverse puis amplification en chaîne par polymérase.

Épreuves sérologiques : *la sérologie est la méthode habituellement utilisée pour déterminer la prévalence de l'infection dans les populations de chevaux, et aussi pour le diagnostic individuel chez les sujets malades. Les techniques utilisées sont la séroneutralisation virale (SN), l'inhibition de l'hémagglutination, et la fixation du complément. Il existe des réactions sérologiques croisées avec d'autres flavivirus, comme le virus de West Nile, qui peut compliquer le diagnostic. La technique de neutralisation du virus (SN) est la méthode la plus spécifique. Elle permet de différencier une infection par le virus de l'EJ des infections par d'autres flavivirus. La meilleure méthode est l'épreuve de SN par réduction des plaques.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *il existe un vaccin à virus inactivé préparé à partir d'une suspension virale obtenue à partir de cerveaux de souris infectées ou de cultures cellulaires infectées.*

A. INTRODUCTION

L'encéphalite japonaise (EJ) est une maladie des chevaux causée par un *Flavivirus* transmis par les moustiques qui provoque des signes cliniques d'encéphalite chez les animaux infectés et qui peut être mortelle (9, 12). Le virus infecte aussi l'homme. Il cause des mortinatalités et des avortements chez les porcs. Ces derniers jouent un rôle d'amplificateur du virus, et les oiseaux peuvent être aussi impliqués dans sa diffusion. Le virus de l'encéphalite japonaise est très répandu dans les pays d'Asie de l'est, du sud-est et du sud. Il récemment gagné les régions occidentales de l'Inde et du Pacifique y compris l'archipel indonésien oriental, la Nouvelle-Guinée et le

nord de l'Australie (17). Un seul sérotype du virus de l'EJ a été identifié bien que des différences antigénique et génétique ont été démontrées par diverses techniques telles que les épreuves de fixation du complément, d'inhibition de l'héماغglutination et de séroneutralisation utilisant des anticorps poly- ou monoclonaux (1, 2, 10, 11, 15) et des analyses de profils de migration d'oligonucléotides en gel de l'ARN viral (3, 13). Sur la base de l'analyse d'une séquence de 240 nucléotides de la région pré-membrane du virus (prM), les souches de virus de l'EJ sont classées en 4 génotypes (5, 6). Récemment, le séquençage du gène de l'enveloppe (E) a montré qu'il était un bon candidat pour une analyse phylogénétique du virus de l'EJ. À l'heure actuelle, 5 génotypes ont été décrits sur la base de l'analyse phylogénétique de ce gène (18, 20, 21).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Le diagnostic de confirmation de l'EJ chez les chevaux repose sur l'isolement du virus responsable. Le taux d'isolement du virus à partir des animaux malades ou morts est habituellement très faible, en raison de l'instabilité du virus dans certaines conditions d'environnement, et aussi de la présence d'anticorps chez les animaux infectés. Les constatations cliniques, sérologiques et anatomopathologiques sont une aide au diagnostic. Le diagnostic est aussi possible par détection des anticorps IgM et IgG spécifiques dans le liquide cébrospinal par des méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) (4). L'acide nucléique viral a été détecté par la technique de la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) dans l'encéphale de chevaux infectés (16).

Les prélèvements à réaliser pour l'isolement du virus sont une partie du corps strié, du cortex ou du thalamus d'encéphale de chevaux affectés. Des prélèvements de sang et de moelle épinière peuvent aussi être utilisés pour l'isolement du virus. Tous les prélèvements doivent être placés au froid immédiatement après récolte, et congelés à -80°C si l'isolement doit être différé dans le temps. Tous les matériels potentiellement infectés doivent être manipulés suivant les procédures de niveau 3 (voir le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries ») pour prévenir tout risque de contamination humaine. L'homme peut se contaminer par contact direct du matériel infectieux avec une peau lésée ou les muqueuses, par inoculation parentérale accidentelle ou par aérosol. Les personnes réalisant les prélèvements devraient aussi prendre les précautions appropriées pour éviter toute contamination. Un vaccin humain est disponible et toutes les personnes à risque, vétérinaires ou personnels de laboratoire, devraient être vaccinées.

1. Identification de l'agent pathogène

Les prélèvements d'encéphale et de moelle épinière sont homogénéisés (à 10 %) dans une solution saline tamponnée à pH 7,4, contenant du sérum de veau (2%) ou de la sérumalbumine bovine (0,75 %), de la streptomycine (100 µg/ml) et de la pénicilline (100 unités/ml). Le sérum de veau doit être exempt d'anticorps dirigés contre le virus de l'EJ. La suspension est centrifugée à 1 500 *g* pendant 15 min, et le surnageant est prélevé pour l'inoculation. Un volume de 0,02 ml est inoculé par voie intracérébrale à des souris âgées de 2 à 4 jours. Ces souris sont gardées en observation pendant 14 jours. Il est possible qu'aucun signe clinique net ne se développe, mais l'anorexie est révélée par la disparition des taches de lait blanches sur l'abdomen. La peau change ensuite de couleur, passant de rosée à rouge foncé, et des convulsions apparaissent juste avant la mort. Les cerveaux des souris mortes ou moribondes sont collectés et stockés à -80°C pour un passage ultérieur.

Pour identifier le virus, un antigène extrait sur saccharose/acétone est préparé à partir des cerveaux des souris après un second passage effectué suivant la procédure décrite précédemment (section B.2.b.1). Cet antigène est testé pour sa capacité à agglutiner les globules rouges de poulet de 1 jour ou d'oie à des pH compris entre 6,0 et 7,0, avec des intervalles de pH de 0,2 conformément à la procédure décrite (8). Des suspensions de globules rouges à 1/24 sont préparées dans les solutions correspondant aux différents pH. L'extrait antigénique est dilué de façon sériée de 2 en 2 sous un volume de 25 µl dans une plaque de microtitrage à 96 puits (puits à fond rond). Puis 25 µl de chaque suspension de globules rouges sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est incubée à 37°C pendant 1 h, avant lecture du résultat de l'héماغglutination. Si l'antigène a la capacité d'agglutiner les globules rouges, il est utilisé lors d'une épreuve d'inhibition de l'héماغglutination avec un sérum contre l'EJ.

Des cultures primaires de cellules d'embryon de poulet, de rein de singe vert africain (Vero), de rein de hamster (BHK) ou des lignées cellulaires de moustique C6/C36 (lignée cellulaire clonée à partir d'*Aedes albopictus*) peuvent être utilisées pour l'isolement viral. Les prélèvements (encéphale, sang prélevé sur les animaux infectés en début de maladie), ou la suspension cérébrale de souriceau après inoculation, sont inoculés dans la culture cellulaire. Des anticorps monoclonaux spécifiques des *Flavivirus* et du virus de l'EJ peuvent être utilisés pour identifier le virus par immunofluorescence indirecte (16). Une épreuve de RT-PCR peut aussi être conduite pour identifier le virus de l'EJ dans les échantillons cliniques ou les surnageants de culture cellulaire en utilisant des amorces appropriées spécifiques du virus de l'EJ (7, 14, 16, 19).

2. Épreuves sérologiques

Les épreuves sérologiques sont utiles pour déterminer la prévalence de l'infection dans une population animale, la distribution géographique du virus, et le niveau de production des anticorps chez les chevaux vaccinés. Si les épreuves sérologiques sont utilisées pour le diagnostic individuel de la maladie, il faut tenir compte du fait que les chevaux vivant en zone d'enzootie peuvent avoir déjà été infectés de façon inapparente ou avoir été vaccinés. La validité des résultats repose sur une augmentation significative du titre sérologique sur des prélèvements réalisés pendant la phase aiguë et la phase de convalescence. La spécificité de chaque épreuve sérologique devrait être aussi considérée. Un test d'agglutination au latex mis au point pour détecter les anticorps dirigés contre le virus de L'EJ chez le porc a été récemment décrit (22).

Dans certaines régions du monde, il est nécessaire, avant de poser un diagnostic de certitude d'encéphalite japonaise, de réaliser des tests complémentaires destinés à éliminer une infection par des virus antigéniquement proches. C'est le cas en Australie, par exemple, où les animaux peuvent être infectés par le virus de l'encéphalite de la vallée de Murray et le virus Kunjin, deux virus étroitement rattachés sur le plan antigénique au virus de l'EJ. La récente expansion du virus West Nile en Amérique du nord, où l'infection par le virus de l'encéphalite de Saint Louis était enzootique, démontre l'aptitude des *Flavivirus* à s'adapter à des environnements nouveaux. La présence d'anticorps dirigés contre ces autres flavivirus peut compliquer le diagnostic de l'encéphalite japonaise, d'autant qu'il existe des réactions croisées entre les flavivirus quel que soit le test. La séroneutralisation par réduction des plages est la méthode la plus spécifique.

a) Séroneutralisation virale

L'épreuve de séroneutralisation par réduction des plages utilisant des cultures primaires de cellules d'embryon de poulet, des cultures de cellules de reins de singe vert d'Afrique (Vero), ou des cultures de cellules de reins de jeune hamster (BHK) est sensible et la plus spécifique des épreuves sérologiques disponibles. Les réactions croisées avec les autres *Flavivirus* sont minimales ; cependant, si un animal présente un titre élevé vis-à-vis d'un autre *Flavivirus*, il peut présenter un titre faible d'anticorps neutralisants dirigés contre le virus de l'EJ.

Le virus de l'encéphalite japonaise (souche Nakayama ou souche JaGAR-01) est inoculé par voie intracérébrale à des souriceaux âgés de 1 jour. L'encéphale des souriceaux morts ou moribonds est prélevé et mis en suspension dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) de pH 7,2, contenant 10 % de sérum de veau fœtal. La suspension est centrifugée à 5 000 *g* pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant est stocké sous forme d'aliquotes à –80 °C. Le milieu de culture de cellules infectées peut aussi être utilisé.

• Protocole

- i) Inactiver les sérums par chauffage à 56 °C au bain marie pendant 30 min.
- ii) Réaliser des dilutions sériées des sérums de 2 en 2 allant du 1/10 au 1/160 en milieu de culture cellulaire dans des plaques de 24 puits à fond plat (diamètre des puits : 17 mm) ou des tubes.
- iii) Diluer le stock de virus dans le milieu de culture de façon à obtenir 100 UFP (unité formant plage) dans 0,2 ml.
- iv) Mélanger un volume de chaque dilution de sérum avec un volume égal de dilution de virus. Inclure dans chaque plaque un témoin virus avec le milieu de culture, un témoin sérum négatif et un témoin sérum positif.
- v) Incuber l'ensemble pendant 90 min à 37 °C.
- vi) Ajouter 200 µl de chaque mélange sérum-virus dans chaque puits (plaque 24 puits) de culture cellulaire où se trouvent les cellules BHK-21.
- vii) Incuber les plaques pendant 90 min à 37 °C sous atmosphère de CO₂.
- viii) Retirer l'inoculum et ajouter 1 ml de milieu de recouvrement (1,5 % de carboxyméthyl cellulose, 1 % de sérum de veau fœtal dans du milieu de Eagle).
- ix) Incuber les plaques pendant 4 jours à 37 °C sous une atmosphère de CO₂.
- x) Après avoir retiré le milieu de culture, fixer avec une solution contenant 2,5 % de bichromate de potassium, 5 % d'acide acétique glacial et 5 % de formol pendant 30 min à température ambiante (utiliser des gants de caoutchouc pour manipuler la solution de fixation).
- xi) Colorer avec une solution de cristal violet à 0,1 % pendant 30 min à température ambiante.
- xii) Retirer le colorant et rincer les cellules avec de l'eau du robinet.
- xiii) Laisser sécher à l'air libre et compter les plages.

- xiv) La concentration du sérum en anticorps est exprimée par la dilution du sérum entraînant une réduction de 50 % des plaques de lyse comptabilisées dans le témoin virus (témoin sans sérum).

b) Inhibition de l'hémagglutination

L'inhibition de l'hémagglutination (IHA) est une épreuve couramment utilisée pour le diagnostic de l'EJ, mais des réactions croisées avec d'autres *Flavivirus* sont observées. Pour cette épreuve, le sérum doit être préalablement traité avec de l'acétone ou du kaolin, et ensuite adsorbé avec des globules rouges homotypiques pour retirer les hémagglutinines non spécifiques. Des globules rouges d'oie ou de poussins d'un jour sont utilisés à un pH optimal compris entre 6,6 et 7. L'épreuve devrait être réalisée avec des sérums traités et 8 unités d'antigène de référence ; cet antigène est commercialement disponible dans quelques pays.

- **Hémagglutination (HA)**

- **Préparation de l'antigène viral**

1. *Extraction sur saccharose et acétone de l'antigène produit sur encéphales de souris infectés*

- i) Homogénéiser l'encéphale des souris dans 4 volumes d'une solution de saccharose à 8,5 %.
- ii) Ajouter goutte-à-goutte l'homogénat dans 20 fois son volume d'acétone.
- iii) Centrifuger (500 *g* pendant 5 min), puis retirer le surnageant.
- iv) Resuspendre le culot avec le même volume que précédemment d'acétone glacée, et laisser dans de la glace pendant 1 h.
- v) Centrifuger (500 *g* pendant 5 min), puis retirer le surnageant.
- vi) Mélanger les culots dans un même tube avec l'acétone glacée.
- vii) Centrifuger (500 *g* pendant 5 min), puis retirer le surnageant.
- viii) Disperser le culot au fond du tube et sécher sous vide pendant 1 à 2 h.
- ix) Dissoudre le culot séché avec une solution physiologique salée (0,4 du volume initial de l'homogénat).
- x) Centrifuger à 8 000 *g* pendant 1 h à 4 °C. Le surnageant (l'antigène) est prêt à l'emploi.

2. *Antigène produit à partir de cellules infectées d'insecte (Aedes albopictus), clone C6/C36*

- i) Récolter le surnageant de culture des cellules infectées après une semaine d'incubation à 28 °C.
- ii) Centrifuger à 1 000 *g* pendant 15 min. Le surnageant (antigène) est prêt à l'emploi.

- **Préparation des globules rouges d'oie**

1. *Solutions*

Acide-citrate-dextrose (ACD) : 11,26 g de citrate de sodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ; 4,0 g d'acide citrique ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ; 11,0 g de dextrose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) ; eau distillée pour un volume final de 500 ml. Stérilisation à l'autoclave à 10 lb (1,7 unités de pression) pendant 10 min.

Dextrose-gélatine-véronal (DGV) : 0,58 g de véronal (Barbital) ; 0,60 g de gélatine ; 0,38 g de véronal sodique (barbital sodique) ; 0,02 g (0,026 g) de CaCl_2 (pour $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ; 0,12 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 8,50 g de NaCl ; 10,0 g de dextrose ; eau distillée pour un volume final de 1 000 ml. Stérilisation à l'autoclave à 10 lb (1,7 unités de pression) pendant 10 min (il est plus facile préparer d'emblée un volume 5 fois plus grand).

2. *Saignée*

Prélever 8,5 ml de sang sur 1,5 ml de ACD (ou 2,8 ml de sang sur 0,5 ml d'ACD).

3. *Lavage (stérile)*

- i) Un volume de sang total pour 2,5 volumes de DGV. Centrifuger (500 *g* pendant 15 min), puis éliminer le surnageant.
- ii) Resuspendre le culot globulaire dans 3 volumes (analogue au volume initial de sang total) de DGV.
- iii) Centrifuger (500 *g* pendant 15 min), puis éliminer le surnageant. Répéter les étapes 2 et 3 encore à deux reprises (soit au total 4 séries de lavage).
- iv) Transférer la suspension finale de globules rouges dans un flacon fermé avec du papier d'aluminium.

4. Ajustement de la concentration globulaire

- 0,2 ml de la suspension de globules rouges + 7,8 ml de NaCl à 0,9 % (dilution à 1/40).
- Relever la densité optique pour une longueur d'onde de 490 nm (DO_{490}) dans un spectrophotomètre avec un tube de 10 mm.
- Ajuster le stock de globules rouges de telle sorte que la dilution à 1/40 donne une DO_{490} de 0,450 (volume final = volume initial \times absorbance à la $DO_{490}/0,450$).
- Stocker les globules rouges dans un réfrigérateur 3 semaines au plus.
- Avant emploi, resuspendre doucement les globules rouges et les diluer à 1/24 dans le diluant d'ajustement du virus (VAD : Virus-adjusting diluent).

• Dilution de l'antigène

- Solutions courantes (qui devraient être maintenues à 4 °C) : *NaCl 1,5 M* (87,7 g de NaCl et eau distillée pour un volume final de 1 000 ml) ; *acide borique 0,5 M* (30,92 g de H_3BO_3 et eau distillée chaude pour un volume final de 700 ml - dissoudre l'acide borique et refroidir) ; *NaOH 1 N* (40,0 g de NaOH et eau distillée pour un volume final de 1 000 ml) ; *borate salin (BS)*, pH 9,0 (80 ml de NaCl 1,5 M, 100 ml de H_3BO_3 0,5 M, 24 ml de NaOH 1,0 N, et eau distillée pour 1 volume final de 1 000 ml) ; *albumine bovine à 4 %* (4 g d'albumine bovine fraction V [Laboratoires Armour]), 90 ml de BS, pH 9,0, pH ajusté à 9,0 avec du NaOH 1N, et BS, pH 9,0, pour obtenir un volume final de 1 000 ml).
- Diluant pour l'antigène* : albumine bovine à 0,4 % dans du borate salin (BABS) : 10 ml d'albumine bovine à 4 %, pH 9,0, et 90 ml de BS, pH 9,0.
- Dilution sériée de 2 en 2 de l'antigène dans le BABS dans une plaque de microtitrage (avec puits en U).

• Addition des hématies d'oie

1. Solutions à préparer

NaCl 1,5 M

Na₂HPO₄ 0,5 M : 70,99 g de Na₂HPO₄ (pour Na₂HPO₄, 12 H₂O : 179,08 g), et eau distillée pour un volume final de 1 000 ml.

Na₂HPO₄ 1,0 M : 138,01 g de NaH₂PO₄·H₂O (pour Na₂PO₄, 2H₂O : 156,01 g), et eau distillée pour un volume final de 1 000 ml.

2. Solution de travail : diluant d'ajustement du virus (VAD)

VAD	NaCl 1,5 M	Na ₂ HPO ₄ 0,5 M	NaH ₂ PO ₄ 1,0 M	
6,0	100	32	184	
6,2	100	62	160	Ajouter de l'eau
6,4	100	112	144	distillée pour
6,6	100	160	120	un volume final
6,8	100	192	104	de 1 000 ml
7,0	100	240	80	

Les valeurs du diluant (VAD) ne correspondent pas au pH de chaque VAD, mais au pH obtenu après que chaque VAD ait été mélangé à un volume égal de BABS, pH 9,0.

3. Protocole

- 1 volume de globules rouges d'oie pour 23 volumes de VAD (dilution à 1/24).
- Ajouter 25 μ l de globules rouges dilués dans chaque puits de la plaque de microtitrage contenant les dilutions d'antigène (25 μ l/puits).
- Incuber 1 h à 37 °C, puis lire les résultats.
 - ++ Agglutination complète (les globules rouges agglutinés forment une mince pellicule uniformément répartie sur le fond concave du puits).

- + Agglutination partielle (les globules rouges forment un anneau associé à une pellicule rugueuse ou plus mince).
- ± Agglutination minimale (les globules rouges forment un bouton entouré d'une pellicule mince ou hétérogène).
- Agglutination négative (bouton clairement défini sans film de globules rouges).

Le point final correspond à la dernière dilution (dilution la plus forte) dans laquelle ++ ou + est observé.

Le titre est la réciproque de la dilution correspondant au point final.

- **Inhibition de l'héماغglutination**

- **Préparation du sérum à tester**

1. *Saignée et séparation des sérums*

- i) Incuber l'échantillon sanguin à 37 °C pendant 1 h et ensuite à 4 °C pendant la nuit. Si l'épreuve doit être réalisée immédiatement, l'incubation pendant la nuit peut être remplacée par une incubation pendant 2 à 3 h à 37 °C.
- ii) Centrifuger (2 000 **g** pendant 15 min) pour séparer le sérum du caillot.
- iii) Inactiver par chauffage à 56 °C pendant 30 min.
- iv) Conserver à –20 °C si l'épreuve n'est pas réalisée immédiatement.

2. *Traitement au 2-mercaptoéthanol (réaliser cette étape lorsque les titres en anticorps IgM doivent être déterminés)*

- i) Placer 50 µl de sérum dans deux petits tubes.
- ii) Ajouter 150 µl de 2-mercaptoéthanol 0,13 M en PBS dans le premier tube, et 15 µl de PBS dans le second tube.
- iii) Incuber à 37 °C pendant 1 h, puis refroidir dans un bain de glace.

3. *Extraction à l'acétone*

- i) Placer 2,5 ml d'acétone glacée dans chaque tube. Mettre des bouchons en caoutchouc et extraire pendant 5 min dans un bain de glace.
- ii) Centrifuger à froid (1 500 **g** pendant 5 min), puis enlever le surnageant.
- iii) Répéter les étapes i et ii une fois encore.
- iv) Étaler le culot à l'intérieur des tubes et sécher par le vide durant 1 h à température de la pièce.
- v) Ajouter 0,5 ml de PBS à pH 9,0, dans chaque tube. Mettre des bouchons en caoutchouc. Laisser le sédiment se dissoudre durant la nuit à 4 °C pour obtenir une dilution des sérums à 1/10.

4. *Extraction au kaolin comme alternative à l'extraction à l'acétone*

- i) Kaolin lavé à l'acide (Fischer) à 25 % en BS, pH 9,0.
- ii) 1 volume de sérum pour 4 volumes de BS et 5 volumes de kaolin à 25 %.
- iii) Extraire pendant 20 min à température de la pièce en agitant de temps en temps.
- iv) Centrifuger (30 min à 1 000 **g**). Les surnageants représentent la dilution 1/10 des sérums.

5. *Adsorption avec les globules rouges d'oie*

- i) Ajouter à 1/50 les globules rouges (culot) d'oie à chaque sérum à traiter.
- ii) Adsorber pendant 20 min dans un bain de glace.
- iii) Centrifuger (10 min à 800 **g**). Le surnageant est prêt pour l'épreuve d'IHA (dilution à 1/10).

- **Épreuve d'inhibition de l'héماغglutination (IHA)**

1. *Premier titrage de l'antigène*

Diluer l'antigène pour obtenir 8 unités dans 50 µl.

2. *Dilution sériée de 2 en 2 des sérums à tester en microplaque*

Réaction sérum-antigène

Ajouter 25 µl d'antigène dilué dans chaque puits contenant les sérums à tester dilués. Placer le reste de l'antigène dans les cupules vides et incubé une nuit à 4 °C.

3. *Titration secondaire de l'antigène*

- i) Faire des dilutions sériées de 2 en 2 de l'antigène préparé (8 unités/50 µl) en conservant un volume de 25 µl.
- ii) Ajouter 25 µl de BABS dans chaque puits pour avoir 50 µl par puits.

4. *Addition des globules rouges d'oie*

- i) Diluer le stock de globules rouges (1/24) dans le VAD.
- ii) Distribuer 50 µl dans chaque puits contenant 50 µl de mélange sérum + antigène ou 50 µl d'antigène du titrage secondaire.
- iii) Incuber à 37 °C pendant 1 h, puis lire le résultat.

Le titre IH du sérum est la réciproque de la dilution la plus élevée du sérum à tester montrant une inhibition complète de l'HA.

5. *Interprétation des résultats*

Une différence de 4 dilutions entre le sérum précoce prélevé en phase aiguë et le sérum tardif prélevé en phase de convalescence est considérée comme une augmentation ou une diminution significative. Elle permet le diagnostic d'infection par un virus antigéniquement rattaché à celui utilisé dans l'épreuve.

c) **Fixation du complément**

La fixation du complément (FC) est parfois employée pour le diagnostic sérologique. L'antigène pour ce test est extrait par l'acétone/éther (mélange à volume égal) à partir des cerveaux de souris inoculées.

• **Préparation de l'antigène**

- i) Extraire et peser les cerveaux des souris inoculées mortes.
- ii) Ajouter à ces cerveaux 20 volumes d'acétone glacée, placer à –20 °C, et homogénéiser.
- iii) Centrifuger la suspension pendant 5 min à 5 000 *g* à 4 °C, et retirer le surnageant.
- iv) Ajouter au culot le même volume d'acétone glacée comme déjà réalisé dans l'étape ii au-dessus, et bien mélanger.
- v) Extraire avec l'acétone en conservant le culot à –20 °C pendant 20 min, et refaire la centrifugation décrite dans l'étape iii au-dessus.
- vi) Répéter les étapes iv et v.
- vii) Répéter les étapes iv et v, en utilisant cette fois de l'acétone/éther (mélange à volume égal).
- viii) Répéter les étapes iv et v 2 fois en utilisant de l'éther glacé.
- ix) Retirer le surnageant par aspiration et étaler le culot au fond du tube à centrifuger.
- x) Sécher sous vide pendant 1 à 2 h.
- xi) Dissoudre le culot dans de l'eau physiologique froide (2 ml/g de cerveau) et placer à 4 °C durant la nuit.
- xii) Centrifuger 1 h à 5 000 *g*. Le surnageant constitue l'antigène.

• **Protocole**

- i) Inactiver par la chaleur les sérums à tester dilués au 1/4 dans du tampon gélatine-véronal.
- ii) Réaliser une dilution sériée de 2 en 2 des sérums dans une plaque de microtitrage à 96 puits (25 µl).
- iii) Ajouter 4 unités d'antigène sous un volume de 25 µl et mélanger par vibration.
- iv) Ajouter 2 unités de complément sous un volume de 50 µl (pool de sérums frais de cobaye).
- v) Mélanger par vibration et incubé 18 h à 4 °C.

- vi) Laisser la plaque de microtitrage à température de la pièce pendant 15 min.
- vii) Ajouter dans chaque puits 25 µl d'hématies de mouton sensibilisées.
- viii) Mélanger par vibration et incubé 30 min à 37 °C, puis lire le résultat.
- ix) La dilution la plus élevée des sérums à tester ne montrant aucune hémolyse représente le titre de ces sérums en FC. Une multiplication ou une division du titre par 4 ou plus est considérée comme significative.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Le vaccin contre l'encéphalite japonaise chez les chevaux est préparé par inactivation d'une suspension virale dérivée de cerveaux de souris ou de cultures cellulaires infectées.

Les instructions pour la production des vaccins vétérinaires sont données dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont d'ordre général et peuvent être complétées par les exigences nationales et régionales.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

La souche Beijing-1 du virus de l'encéphalite japonaise est utilisée pour la production du vaccin au Japon. La souche doit être létale pour les souris quant elle est inoculée par voie intracérébrale, et doit pouvoir se répliquer dans une culture primaire de cellules de rein de porc. Cette souche a la capacité d'agglutiner les hématies d'oie, de poussin de 1 jour ou de pigeon. Le virus doit pouvoir être neutralisé par un antisérum de référence dirigé contre le virus de l'encéphalite japonaise.

b) Méthodes de culture

Le virus initial et le virus de semence devraient être produits sur cerveaux de souris ou en cultures de cellules. Le nombre de passages ne devrait pas excéder 3 passages pour le virus initial et deux passages pour le virus de semence.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Le vaccin produit à partir de cette souche induit une protection des équins contre l'encéphalite et prévient la naissance de porcelets mort-nés chez les truies gestantes.

Il est recommandé que le virus initial et le virus de semence soient conservés en dessous de –70 °C, ou en dessous de 5 °C après lyophilisation.

2. Méthode de fabrication

Le virus est multiplié sur cerveaux de souris âgées de 3 à 4 semaines ou sur culture cellulaire en monocouche. Les cultures doivent être contrôlées pour s'assurer qu'elles ne contiennent pas d'agents pathogènes extérieurs (Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »). Le virus de semence est inoculé aux souris par voie intracérébrale. Les cerveaux des souris qui présentent des symptômes sévères d'encéphalite sont collectés. Ils sont broyés et homogénéisés en PBS, centrifugés à 1 500 **g** pendant 30 min ; le liquide surnageant représente la suspension de virus.

Le virus de semence est inoculé à des cultures de cellules et les liquides sont ensuite récoltés séparément pour chaque lot lorsque la réplique virale atteint son maximum. Ce liquide est filtré, ou centrifugé à 1 500 **g** pendant 30 min ; le liquide surnageant représente la suspension de virus.

Du formol (0,5%) est ajouté à la suspension afin d'inactiver le virus vivant ; on considère qu'il s'agit de « la suspension non diluée de virus ». Un adjuvant peut être ajouté pour augmenter son pouvoir immunogène.

3. Contrôles en cours de fabrication

Des contrôles devraient être effectués sur la suspension virale, d'une part par les techniques classiques de culture pour rechercher la présence de contaminants bactériens, d'autre part par inoculation intracérébrale à la souris ou inoculation de cultures de cellules pour la présence de virus infectieux. La suspension virale inactivée non diluée devrait être de nouveau contrôlée par culture et examen microscopique après coloration pour rechercher une contamination bactérienne. Elle devrait être en outre contrôlée par inoculation intracérébrale à la souris pour s'assurer de la complète inactivation du virus par le formol.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Les tests destinés à contrôler la stérilité et l'absence de contamination des matériaux biologiques peuvent être trouvés dans le Chapitre 1.1.9.

b) Innocuité

Dix souris âgées de 3 jours sont inoculées par voie intracérébrale avec 0,02 ml du produit final, et sont mises en observation durant 14 jours afin de s'assurer (par l'absence de mortalité) de la complète inactivation du virus vivant.

5. Contrôles du produit fini

a) Stérilité

Les tests destinés à contrôler la stérilité et l'absence de contamination des matériaux biologiques peuvent être trouvés dans le Chapitre 1.1.9.

b) Innocuité

Voir le paragraphe C.4.b.

c) Détermination de la concentration en formol

La concentration en formol devrait être trouvée inférieure à 0,2 % (v/v) par les méthodes habituelles de quantification.

d) Activité

Le produit final doit être contrôlé, afin de s'assurer de son pouvoir immunogène, par des tests de protection chez la souris. Le produit est dilué au dixième dans du PBS ; 30 souris âgées de 2 à 3 semaines sont inoculées par voie intrapéritonéale, 2 fois à 3 jours d'intervalle, avec 0,1 ml du produit dilué. Il devrait y avoir un groupe témoin équivalent non inoculé. 8 jours après la première inoculation, toutes les souris subissent une épreuve virulente par injection intrapéritonéale d'une dose définie de virus vivant. Le pourcentage de survivants dans le groupe vacciné devrait être supérieur à 40 % et le taux de mortalité dans le groupe témoin devrait être supérieur à 90%. Le titre du virus d'épreuve ne devrait pas être inférieur à 10^3 DL₅₀ (dose létale 50 %) par 0,2 ml.

e) Stabilité

Conservé à 4 °C, le produit final doit rester pleinement efficace pendant 12 mois.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALI A. & IGARASHI A. (1997). Antigenic and genetic variations among Japanese encephalitis virus strains belonging to genotype 1. *Microbiol. Immunol.*, **41**, 241–252.
2. BANERJEE K. (1986). Certain characteristics of Japanese encephalitis virus strains by neutralization test. *Indian J. Med. Res.*, **83**, 243–250.
3. BANERJEE K. & RANADIVE S. N. (1989). Oligonucleotide fingerprint analysis of Japanese encephalitis virus strains of different geographical origin. *Indian J. Med. Res.*, **89**, 201–216.

4. BURKE D.S., HISALAK A. & USSERY M.A. (1982). Japanese encephalitis. *In: Proceedings of International Seminar on Viral Diseases in SE Asia and the Western Pacific*, Mackenzie J.S., ed. Academic Press, Sydney, Australia, 537–540.
5. CHEN W.R., TES R.B. & RICO-HESSE R. (1990). Genetic variation of Japanese encephalitis virus in nature. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2915–2922.
6. CHEN W.R., TES R.B. & RICO-HESSE R. (1992). A new genotype of Japanese encephalitis virus from Indonesia. *Am. J. Trop. Me. Hyg.*, **47**, 61–69.
7. CHUNG Y.J., NAM J.H., BAN S.J. & CHO H.W. (1996). Antigenic and genetic analysis of Japanese encephalitis viruses isolated from Korea. *Am. J. Trop. Me. Hyg.*, **55**, 91–97.
8. CLARKE D.H. & CASALS I. (1958). Techniques for haemagglutination with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **7**, 561–573.
9. FENNER F.J., GIBBS E.P.J., MURPHY F.A., ROTT R., STUDDERT M.J. & WHITE D.O. (1992). Flaviviridae. *In: Veterinary Virology, Second Edition*. Academic Press, New York, USA, 441–455.
10. HALE J. H. & LEE L.H. (1954). A serological investigation of six encephalitis viruses isolated in Malaya. *Br. J. Exp. Pathol.*, **35**, 426–433.
11. HASEGAWA H., YOSHIDA M., FUJITA S. & KOBAYASHI Y. (1994). Comparison of structural proteins among antigenically different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine*, **12**, 841–844.
12. HOKE C.H. JR & GINGRICH J.B. (1994). Japanese encephalitis. *In: Handbook of Zoonoses, Second Edition*, Beran G.W., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 59–69.
13. HORI H., MORITA K. & IGARASHI A. (1986). Oligonucleotide fingerprint analysis on Japanese encephalitis virus strains isolated in Japan and Thailand. *Acta Virol.*, **30**, 353–359.
14. JAN L.R., YUEH Y.Y., WU Y.C., HORNG C.B., & WANG G.R. (2000). Genetic variation of Japanese encephalitis virus in Taiwan. *Am. J. Trop. Me. Hyg.*, **62**, 446–452.
15. KIMURA-KURODA J. & YASUI K. (1986). Antigenic comparison of envelop protein E between Japanese encephalitis virus and some other flaviviruses using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, **67**, 2663–2672.
16. LIAN W.C., LIAU M.Y. & MAO C.L. (2002). Diagnosis and genetic analysis of Japanese encephalitis virus infected in horses. *J. Vet. Med. [B] Infect. Dis. Vet. Public Health*, **49**, 361–365.
17. MACKENZIE J.S. (2005). Emerging zoonotic encephalitis viruses: lessons from Southeast Asia and Australia. *J. Neurovirol.*, **11**, 434–440.
18. SOLOMON T., NI H., BEASLEY D.W.C., EKKELINKAMP M., CARDOSA M.J. & Barrett A.D.T. (2003). Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in Southeast Asia. *J. Virol.*, **77**, 3091–3098.
19. TANAKA M. (1993). Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **41**, 311–322.
20. UCHIL P.D. & SACHIDANANDAM V. (2001). Phylogenetic analysis of Japanese encephalitis virus: envelope gene based analysis reveals a fifth genotype, geographic clustering, and multiple introductions of the virus into the Indian subcontinent. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **65**, 242–251.
21. WILLIAMS D.T., WANG L.F. DANIELS P.D. & MACKENZIE J.S. (2000). Molecular characterization of the first Australian isolate of Japanese encephalitis virus, the FU strain. *J. Gen. Virol.*, **65**, 2471–2480.
22. XINGLIN J., HUANCHUN C., QIGAI H., XIANG W., BIN W., DEXIN Q. & LIURONG F. (2002) The development and application of the latex agglutination test to detect serum antibodies against Japanese encephalitis virus. *Vet. Res. Commun.*, **26**, 495–503.

*
* *

LEISHMANIOSE

RÉSUMÉ

*La leishmaniose n'est pas une entité unique, mais elle comprend une variété de syndromes dus essentiellement à 16 espèces et sous-espèces de *Leishmania* aux moins. Les chiens sont communément affectés par *L. infantum* et *L. chagasi* (maintenant considérés comme des synonymes), mais des infections canines avec *L. tropica*, *L. major* et *L. braziliensis* ont également été rapportées. Chez l'homme, le spectre clinique s'étend d'infections asymptomatiques à celles avec une mortalité élevée, avec 3 formes distinctes classiquement décrites : viscérale (VL), cutanée (CL) et mucocutanée (MCL). Les vecteurs de ces maladies sont les moustiques phlébotomine appartenant au genre *Phlebotomus* et *Lutzomyia*.*

Identification de l'agent pathogène : *quand les signes cliniques et les lésions caractéristiques sont présents chez l'homme et l'animal affectés, la démonstration des parasites dans les frottis colorés de rate, moelle osseuse et aspirations des nœuds lymphatiques, dans les raclages de la peau, et dans les biopsies de tissu, donne un diagnostic positif. Si l'infection est de faible niveau, la détection des parasites est possible seulement par essai d'isolement in vitro ou in vivo ou par amplification en chaîne par polymérase (PCR). Comme il y a très peu de différences morphologiques parmi les espèces variées, les *leishmania* isolées doivent être identifiées par des méthodes moléculaire, biochimique et/ou immunologique. Plusieurs centres à travers le monde utilisent à l'heure actuelle la caractérisation d'isoenzyme, d'ADN, et d'antigène pour identifier l'agent.*

Épreuves sérologiques : *la sérologie est la méthode préférée pour le diagnostic de la leishmaniose canine et de la VL, même pendant les phases précoces de la maladie. Dans les formes inapparentes, les cas séropositifs sont confirmés par un diagnostic parasitologique ou par PCR. La sérologie a moins de valeur pour la CL et la MCL. Des épreuves sérologiques disponibles, la recherche d'anticorps par immunofluorescence indirecte (IFI) et par réaction immuno-enzymatique (ELISA) sont celles qui conviennent le mieux. Les antigènes pour le sérodiagnostic doivent être préparés dans le laboratoire, bien que des produits commerciaux soient en cours d'évaluation.*

Épreuve d'hypersensibilité retardée : *l'épreuve cutanée à la leishmanine est utile pour déterminer la distribution des infections humaines, distinguer les cas immuns des non-immuns. L'épreuve est positive dans la CL, MCL et VL après guérison, mais est négative dans la VL active.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *à l'heure actuelle, il n'y a pas de vaccin efficace disponible pour l'utilisation chez le chien ou l'homme. La leishmanine, n'est plus non disponible dans le commerce et doit être standardisée.*

A. INTRODUCTION

La leishmaniose est provoquée par le vecteur parasite protozoaire, *Leishmania*. Diverses formes de manifestations cliniques de la leishmaniose humaine ont été décrites (38), qui peuvent être groupées en 3 entités : la leishmaniose viscérale (VL, kala azar), la leishmaniose cutanée (CL, sore oriental, uta, pian bois, ulcère chiclero) et la leishmaniose mucocutanée (MCL, espundia) (50)¹. Dans le Nouveau Monde¹, les leishmanioses sont provoquées par le complexe *L. braziliensis* (MCL et CL), le complexe *L. mexicana* (CL), *L. peruviana* (CL) et *L. infantum* (VL et CL) ; dans le Vieux Monde, les leishmanioses sont provoquées par

¹ Dans ce chapitre, le terme « Nouveau Monde » se réfère aux Amériques, et le terme Vieux Monde se réfère à l'Europe, l'Afrique et l'Asie.

L. donovani (VL), *L. infantum* (VL et CL), *L. tropica* (CL), *L. major* (CL) et *L. aethiopica* (CL). *Leishmania infantum* et *L. chagasi* ont été trouvées identiques par génotypage biochimique et sont considérées comme des synonymes (29). Les maladies sont principalement des zoonoses à deux exceptions près : la CL due à *L. tropica* dans les zones urbanisées du Proche et du Moyen-Orient et la VL due à *L. donovani* sur le sous-continent indien (nord de l'Inde, Népal et Bangladesh). La leishmaniose canine (CanL) est une maladie chronique viscère-cutanée causée par *L. infantum* (= *L. chagasi*), pour laquelle le chien joue le rôle de réservoir. Dans certains cas, les parasites appartenant au complexe *L. braziliensis*, *L. major* et *L. tropica* ont été isolés à partir de l'hôte (31, 40). Les vecteurs des leishmanioses sont les moustiques phlébotomine appartenant au genre *Lutzomyia* (Nouveau Monde) et *Phlebotomus* (Vieux Monde).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

L'examen clinique des cas suspects, le diagnostic parasitologique et l'immunodiagnostic sont les méthodes de routine disponibles pour le diagnostic de la leishmaniose. Cependant, la démonstration du parasite est la seule voie pour confirmer la maladie d'une manière concluante (23). Dans VL et CanL, l'isolement et l'identification du parasite à partir des biopsies (nœuds lymphatiques, moelle osseuse, et aspiration de la rate) associés à des épreuves moléculaire et immunologique sont recommandés. Le diagnostic parasitologique est nécessaire pour la confirmation de la CL (par grattage des lésions ou aspiration avec une aiguille sur le bord des lésions) car ni l'examen clinique ni la sérologique ne sont suffisants. Les frottis du matériel de biopsie sont colorés avec le Giemsa et examinés au microscope à un grossissement de $\times 600$ -1 000. Le matériel doit aussi être cultivé sur milieux appropriés à 22 - 26 °C.

Les caractéristiques morphologiques des amastigotes (chez les hôtes humains et mammifères) et promastigotes (chez les hôtes invertébrés et dans les cultures) sont les suivantes :

- *Amastigote* : petit organisme intracellulaire de corps arrondi ou ovale, de taille $1,5\text{-}3 \times 2,5\text{-}6,5 \mu\text{m}$, trouvé dans les vacuoles du cytoplasme des macrophages. Il n'a pas de flagelle libre. L'organisme a un noyau relativement grand et un kinétoplaste consistant en un corps comme une baguette et un corps basal comme un point ;
- *Promastigote* : organisme extracellulaire allongé, dont le corps a une taille de $15\text{-}20 \times 1,5\text{-}3,5 \mu\text{m}$ avec un seul flagelle de 15 à 28 μm de long, implantés tout près du kinétoplaste en position antérieure. Le noyau est situé au centre.

Le choix des méthodes d'isolement et de culture dépend des circonstances immédiates et de la capacité techniques et de l'expérience du personnel du laboratoire (45). L'isolement *in vitro* offre certains avantages sur les méthodes *in vivo* : les cultures deviennent positives plus rapidement (5 à 30 jours comparé à des mois pour l'apparition des lésions chez l'animal) et les matériels sont moins coûteux. Cependant, pour l'isolement *in vitro*, les techniques utilisées doivent être exécutées dans des conditions strictes de stérilité ; ce qui est rarement faisable sur le terrain. Malheureusement, il n'existe pas encore de milieu de culture « universel » dans lequel toutes les différentes leishmania pousseraient facilement, et il est presque impossible de prédire quel milieu sera le meilleur pour la croissance d'un isolat particulier de leishmania. Certains laboratoires ont trouvé le milieu le plus convenable parmi les milieux gélosés au sang biphasique et les milieux de culture de tissu additionné de sérum fœtal de veau (14). Quand l'essai d'isolement primaire d'organismes inconnus est entrepris, un milieu gélosé au sang est utilisé : de préférence au milieu NNN (Novy, McNeil et Nicolle), autrement le milieu gélosé infusion cœur-cerveau (BHI) ou le EMTM (milieu de Tobie modifié par Evan) doivent être utilisés. Pour la culture à grande échelle d'un isolat établi, des milieux appropriés sont rapportés dans la Section B.1.a. (voir réf. 14 pour la composition des milieux). Il peut être difficile de cultiver les parasites des patients atteints de VL et de MCL. Quelquefois, même quand l'isolement initial est réussi, les parasites peuvent mourir lorsqu'une sous-culture est effectuée. Ceci semble fréquent surtout quand l'isolement initial a été réalisé dans un milieu riche. Souvent il est possible de surmonter ce problème si les sous-cultures sont réalisées dans un milieu nutritionnellement moins riche, tel que le NNN, ou un milieu semi solide tel que « Evans liquide » ou une gélose au sang semi solide de Locke.

Le hamster (*Mesocricetus auratus*) est l'animal le plus communément utilisé pour l'isolement *in vivo*. Les suspensions de tissu ou les aspirations sont inoculées par voie intradermique dans le nez et/ou les pattes dans le cas de la détection de parasites dermatotropes. Quand le matériel est suspecté être infecté par des parasites provoquant la VL, l'inoculation doit de préférence être faite par voie intrapéritonéale. L'infection résultante devient apparente, des semaines ou des mois plus tard, par le développement d'un nodule ou d'un ulcère au point d'inoculation, et dans le cas de parasites viscerotropes, l'infection devient apparente, des mois plus tard, par une infection massive des organes internes. L'examen des frottis colorés par le Giemsa des suspensions/aspirations

de tissu de hamster montreront des amastigotes. Les souris BAL/c sont communément utilisées pour le diagnostic de *L. major*.

Plusieurs techniques sont maintenant utilisées dans beaucoup de centres pour identifier les différentes espèces de *Leishmania*, sous-espèces ou souches.

- a) La caractérisation des isoenzymes, aussi appelée MLEE (*multi-locus enzyme electrophoresis*) est la méthode de référence pour l'identification des espèces (23, 39, 45, 50) bien qu'elle exige la culture d'un grand nombre de parasites ($5 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$). Les principes de l'électrophorèse des enzymes sont les suivantes : les enzymes solubles sont extraites des organismes qui ont poussé dans les milieux pour la culture en masse (milieu BHI, milieu MEM/FCS/EBLB [milieu essentiel minimal/sérum de veau fœtal/bouillon de Evans au lysat de sang], milieu *Drosophila* de Schneider). Une petite quantité de l'extrait est ensuite placée dans une substance inerte, la matrice, contenant un tampon à un pH fixé. La matrice est d'habitude un gel d'amidon, mais elle pourrait également être de l'acétate de cellulose absorbant, de l'acrylamide ou de l'agarose. Le pH du tampon dans la matrice est d'habitude choisi de sorte que les enzymes soient négativement chargées. Un courant direct est envoyé dans la matrice dans laquelle les ions du tampon jouent le rôle de conducteur. Quand l'électrophorèse est terminée, la plupart des protéines auront migré dans la matrice vers l'anode, selon la quantité de charge négative. Si la matrice est colorée à cette étape avec un colorant général des protéines, beaucoup de bandes seront visibles. Cependant la spécificité élevée du cofacteur et du substrat des enzymes rend possible de colorer seulement ces protéines. Désormais, la mobilité électrophorétique d'une enzyme particulière peut être comparée entre plusieurs organismes. La matrice colorée avec sa collection de bandes d'isoenzymes colorées est reconnue comme un zymogramme. Normalement un ou plusieurs extraits à partir des organismes de référence, dans lesquels les profils des bandes d'enzyme sont bien documentés, sont inclus dans le gel pour aider à l'interprétation des résultats. La plupart des enzymes utilisées pour les besoins de la caractérisation sont colorées par des méthodes incorporant une réaction de déshydrogénase. Au moins 12 enzymes seront examinées : les organismes présentant un zymogramme identique sont classés dans les zymodèmes d'une espèce donnée.
- b) La technique des anticorps monoclonaux (AcM) est appliquée à l'analyse et la classification des espèces et des sous-espèces de *Leishmania* (20). Pour la production des anticorps, des souris BALB/c sont immunisées avec des préparations de membrane à partir soit des promastigotes soit des amastigotes. Les cultures d'hybridome sécrétant les anticorps sont ensuite sélectionnées et clonées par des dilutions limites. La spécificité des souches de *Leishmania* est évaluée grâce à des essais d'immunofluorescence ou d'immunoradiométrie. Cette analyse doit être quantitative, car la quantité du même antigène de surface peut varier parmi les espèces de *Leishmania*. Les anticorps monoclonaux ont aussi été utilisés dans des techniques d'immunohistochimie appliquées sur des biopsies de tissu.
- c) Les sondes d'hybridation de l'ADN sont des outils très spécifiques dont le principe est de permettre de marquer, des séquences d'ADN du kinétoplaste ou nucléaires simple brin à partir de souches standards bien caractérisées pour trouver et hybrider avec des séquences d'ADN homologues à partir ou dans des isolats de *Leishmania* inconnus (19, 44). Seules des séquences d'ADN complémentaires formeront de l'ADN double brins, qui peut être détecté par autoradiographie si la sonde est marquée, ou par réaction immuno-enzymatique. Ces techniques sont assez sensibles pour identifier $10^2 - 10^3$ organismes repérés sur filtres de nylon. Beaucoup moins de parasites (< 10) sont nécessaires pour l'identification par la technique d'hybridation *in situ*.
- e) Les méthodes basées sur la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sont maintenant disponibles pour le diagnostic et/ou l'identification des *Leishmania* à partir d'échantillons humain et canin. Essentiellement, les techniques développées soit pour détecter les organismes à partir de biopsies fraîches, congelées ou fixées au formol et incluses dans la paraffine, soit pour identifier des isolats établis de *Leishmania* comprend : (a) la digestion du matériel avec de la protéine K et l'extraction de l'ADN ; (b) l'amplification par la PCR standard utilisant des séquences d'oligonucléotides (amorces) sélectionnées à partir de petites sous-unités du gène ARNr (28), ou des mini-cercles d'ADN du kinétoplaste (25) ou d'autres séquences d'ADN génomique hautement répétitives (9, 36) ; (c) l'analyse des produits d'amplification par gel d'agarose à 1-2 %. Pour augmenter la sensibilité, une PCR nichée ou semi-nichée utilisant des amorces internes à partir des séquences ci-dessus peut être réalisée. Dans la VL humaine, la PCR a une sensibilité comparable à celle des méthodes basées sur la culture, mais donne des résultats beaucoup plus rapides. Dans la CanL, l'efficacité du diagnostic par la PCR comparée à la sérologie dépend du cours naturel de la maladie, la sensibilité étant la plus élevée brièvement après infection (88 %), déclinant par la suite (50 %) (37). Dans la CL et la MCL américaine, la PCR apparaît logiquement plus sensible que n'importe quelle méthode de diagnostic recommandée auparavant (13). Diverses techniques ont été décrites qui améliorent aussi bien la sensibilité que la spécificité de l'épreuve, telle que la PCR-RFLP au cours de laquelle les produits amplifiés par PCR sont digérés par les enzymes appropriées et le profil des fragments résultant de la restriction est analysé pour l'identification de l'espèce ou de la souche (30, 46). Des techniques de PCR en temps réel permettant le suivi permanent des produits obtenus au cours de l'amplification par la PCR ont été décrites et sont disponibles dans le commerce. Elles peuvent être plus sensibles que la PCR classique

et sont surtout destinées à l'étude des cinétiques d'infection et le suivi de la réponse au traitement (3, 7). En outre, la PCR en temps réel a été signalée comme étant utile pour le dépistage des infections dans des prélèvements peu envahis comme le sang (15).

2. Épreuves sérologiques

Plusieurs épreuves sérologiques sont maintenant utilisées pour détecter les anticorps anti-leishmania. Les valeurs de la sensibilité sont rapportées plus loin pour chaque épreuve, cependant, elles sont appliquées seulement aux individus qui ne sont pas immunodéprimés. Un pourcentage élevé de patients atteints de L et co-infectés avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), s'est révélé séronégatif pour les anticorps anti-leishmania (18).

a) Immunofluorescence indirecte

L'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) est largement utilisée parce qu'elle est facile à réaliser. L'épreuve est spécifique de genre, bien que des réactions croisées significatives aient été signalées chez des individus infectés avec *Trypanosoma cruzi*. Pour ces sujets, les épreuves sérologiques spécifiques basées sur des antigènes recombinés de leishmania seraient plus appropriées (voir Section B.2. b et d ci-dessous). Dans les régions sans maladie de Chagas, l'épreuve d'IFI pour le diagnostic de la CanL ou de la VL cliniques a une sensibilité de 96 % et une spécificité de 98 %, semblables à celles des réactions immuno-enzymatiques (ELISA). Bien que les amastigotes à partir de sections congelées ou des frottis d'organes infectés puissent être utilisés comme antigène, les promastigotes cultivés représentent la source la plus commune d'antigène.

• Préparation de l'antigène

- i) Récolter 3 à 4 ml du milieu liquide d'une culture vieille de 3 jours montrant une croissance des promastigotes florissante (voir section B.1. pour les milieux de culture) ;
- ii) Laver les organismes 3 fois avec une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,2 à 7,4, puis centrifuger à 350 **g** pendant 15 min à la température du laboratoire ;
- iii) Resuspendre le culot cellulaire final dans du PBS et ajuster la concentration des promastigotes à approximativement 4×10^6 /ml à l'aide d'un hémodytomètre ;
- iv) Distribuer 30 µl de la suspension de promastigote sur chaque cercle d'une lame multi-spot et laisser sécher à la température du laboratoire ;
- v) Fixer les promastigotes dans de l'acétone froide pendant 10 min, puis mettre les lames dans une boîte en plastique et conserver dans un congélateur (–35 °C) pendant au maximum 2 à 3 mois.

• Protocole

- i) Laver les lames recouvertes de l'antigène congelé dans du PBS et laisser sécher à la température du laboratoire ;
- ii) Inactiver le sérum pendant 30 min dans un bain d'eau à 56 °C ;
- iii) Faire des dilutions en double du sérum à tester de 1/80 à 1/10 240 pour la VL humain, et de 1/40 à 1/5 120 pour la CanL. Les sérums témoins positif et négatif, à des dilutions de 1/80 et 1/160 pour la VL humaine et de 1/40 et 1/80 pour la CanL, sont aussi inclus dans l'épreuve. Il n'y a pas de sérum standard disponible, mais des standards internes sont préparés et titrés ;
- iv) Distribuer 30 µl des échantillons de sérums dilués sur chaque cercle de la lame et incubé pendant 30 min à 37 °C ;
- v) Éliminer les échantillons de sérum par lavages vigoureux dans du PBS, suivi par l'immersion des lames dans du PBS pendant 10 min. Laisser sécher les lames ;
- vi) Distribuer 30 µl d'anti-immunoglobuline conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine dilué (FITC pour *Fluorescein Isothiocyanate*) sur chaque cercle de la lame et incubé pendant 30 min à 37 °C. Les immunoglobulines anti-humain et anti-chien conjuguées FITC sont disponibles commercialement ;
- vii) Répéter l'étape v et monter avec une lamelle dans quelques gouttes de PBS/glycérol (50 % [v/v] de chaque) ;
- viii) Lire les lames au microscope à fluorescence. La dilution la plus élevée montrant des promastigotes fluorescents est considérée comme le titre en anticorps. Pour la VL humain, le titre seuil s'échelonne

ordinairement de 1/80 à 1/160, tandis que pour la CanL, il va de 1/40 à 1/160. Comme les performances de l'épreuve d'IFI peuvent varier dans différents laboratoires, il vaut mieux pour chaque laboratoire de définir son propre titre seuil en utilisant des sérums de référence négatif et positif définis.

b) Méthode immuno-enzymatique

L'ELISA peut être exécuté sur sérum ou sur un volume de sang précis. Le sang est collecté par piqûre avec une aiguille sur des bandes de papier absorbant approprié et laissé à sécher. L'échantillon est élué et testé à une seule dilution déterminée auparavant pour donner une spécificité et une sensibilité acceptables. Cette épreuve peut être utilisée pour des enquêtes séro-épidémiologiques dans les conditions du terrain.

Dans la méthode classique, l'antigène est préparé comme suit : les promastigotes récoltés à partir des cultures sont lavés 4 fois avec du PBS, pH 7,2, centrifugés à 1 000 *g* pendant 15 min. Les promastigotes du culot sont resuspendus dans 2 fois leur volume d'eau distillée, puis ultrasonnés à une amplitude moyenne dans un bain glacé. La suspension est laissée à 4 °C une nuit pour permettre aux protéines de se dissoudre. Après une centrifugation finale à 4 000 *g* pendant 10 min pour éliminer les débris cellulaires, le surnageant, représentant l'antigène soluble concentré, est distribué dans des flacons et stocké à –20 °C jusqu'à la date prescrite. Pour l'utilisation dans l'épreuve, il est reconstitué avec du PBS à une concentration optimale prédéterminée de protéine (environ 20 µg/ml) comme mesuré par la méthode de Lowry. L'ELISA est utile pour le diagnostic des leishmanioses du Vieux et du Nouveau Monde. Il y a peu ou pas de réactions croisées avec d'autres maladies et, selon les souches de *Leishmania* utilisées, la sensibilité peut varier de 86 % à 99 %.

Une version de l'ELISA, appelée épreuve de dépistage Falcon (FAST-ELISA) et utilisant des perles recouvertes d'antigène, est considérée comme étant adaptable au terrain, sensible et spécifique pour la CanL viscérale avec une sensibilité et une spécificité comparable aux épreuves IFI et ELISA. Le sang total ou plasma peut être évalué rapidement sans l'utilisation d'un microscope ou d'un spectrophotomètre (1).

Un antigène promastigote soluble dans un détergent a été utilisé dans l'ELISA au lieu d'un lysat brut, pour le diagnostic de la CanL. Le détergent était du Triton X-100 et l'extrait protéique était protégé par des inhibiteurs de la protéase. En utilisant cette méthode, la sensibilité de l'ELISA augmentait à 99,5 %, tandis que sa spécificité était comparable avec celle de l'épreuve d'IFI (97 %) (26).

Les méthodes ELISA décrites ci-dessus reposent toutes sur des préparations antigéniques brutes. Plus récemment, un antigène recombiné à partir d'une protéine clonée de *L. infantum*, appelée rK39, a été signalé comme étant hautement réactif avec des sérums de cas de leishmaniose viscérale humaine et canine quand il était utilisé dans une formule ELISA. En utilisant 25 à 50 ng d'antigène, une sensibilité et une spécificité de 99 % étaient constamment trouvées pour les patients immunocompétents avec la VL clinique et pour les chiens avec une maladie démontrée parasitologiquement (2, 41). Chez les patients positifs au VIH, le K39-ELISA montrait une sensibilité plus élevée (82 %) que l'épreuve d'IFI (54 %) (24). L'antigène K39, qui montre une stabilité et une reproductibilité remarquables, est maintenant produit et commercialisé.

c) Épreuve d'agglutination directe

L'épreuve d'agglutination directe (DAT) a été décrite pour le diagnostic de la VL et de la CanL. Après le développement de l'épreuve, le DAT a été validé comme un test sensible et spécifique pour les investigations de terrain (4, 10, 35). L'antigène consiste en promastigotes récoltés à partir de cultures, lavés dans du PBS, pH 7,2, traités avec de la trypsine à 0,4 % pendant 45 min à 37 °C et puis lavés à nouveau, et colorés avec 0,02 % de bleu de Coomassie. Des dilutions en série double de sérum dans du PBS sont faites dans des puits de plaques de microtitrage à fond en V ; 50 µl de préparation antigénique sont additionnés dans chaque puits, puis la plaque est agitée avec soin à la main et laissée pendant 18 h à la température de la pièce. L'épreuve est lue à l'œil nu contre un fond blanc. Les réactions positives sont indiquées par une tache claire tranchant sur le bleu.

Une DAT modifiée pour la détection d'anticorps anti-leishmania spécifiques chez des hôtes réservoirs canins est considérée hautement appropriée pour des travaux écologique et épidémiologique de grande échelle sur le terrain, et pour le diagnostic de la CanL, ayant une sensibilité de 100 % et de spécificité de 98,9 % (21, 22). La fiabilité de l'épreuve a été améliorée en traitant les sérums à tester avec 0,2 M de 2-mercaptoethanol et en les incubant à 37 °C.

d) Épreuve rapide d'immunochromatographie (dipstick ou strip-test)

Une épreuve rapide d'immunochromatographie utilisant comme antigène K39 (K39 dipstick ou strip-test, disponible dans le commerce) a été évaluée dans différentes situations d'endémicité de VL. La bandelette de nitrocellulose du kit comprend un tampon absorbant à une extrémité, une zone avec un anticorps anti-protéine A fixé dessus (utilisé pour détecter les IgG), à l'autre extrémité (zone témoin), et une zone avec

l'antigène rK39 au milieu (zone de réaction). Un conjugué protéine A-or colloïdal est utilisé comme réactif de révélation de la réaction immunochromatographique. Une petite goutte de sérum à tester (20 µl) est placée sur le tampon absorbant avant d'ajouter deux grosses gouttes de tampon (100 µl) ; on laisse migrer le mélange le long de la bandelette par capillarité. Après 2 à 10 min, le résultat est positif si deux lignes rouges distinctes apparaissent (une dans la zone de réaction et l'autre dans la zone témoin) ; il est négatif si aucune ligne n'apparaît dans la zone de réaction et il est ininterprétable si une ligne n'apparaît pas au niveau de la zone témoin.

Sur des cas cliniques de VL humaine, le K39 dipstick a révélé une sensibilité de 100 % et une spécificité de 93 % en Inde (43), une sensibilité de 90 % et une spécificité de 100 % au Brésil (11), et des sensibilité et spécificité de 100 % dans le bassin Méditerranéen (8). Sur des cas avérés de CanL, tant inapparents que cliniques, la sensibilité du K39 dipstick était de 97 % et la spécificité de 100 % (34).

3. Épreuve d'hypersensibilité retardée

L'hypersensibilité retardée est une caractéristique importante de toutes les leishmanioses humaines et peut être mesurée par le test à la leishmanine, aussi connue comme la réaction de Monténégro (27). L'épreuve cutanée à la leishmanine n'a pas de valeur pour le diagnostic de la CanL. La leishmanine est une suspension tuée de promastigotes entiers ($0,5-1 \times 10^7/\text{ml}$) ou détruits (250 µg de protéine/ml) dans une solution saline sans pyrogène contenant du phénol. Une réaction retardée se développe et est lue 48 à 72 h plus tard.

Le taux de réaction faussement positive chez des personnes saines est approximativement de 1 %, mais il peut être plus élevé dans les régions où existe un contexte de leishmaniose, car dans ce cas, beaucoup de populations saines peuvent présenter un taux de sensibilité assez élevé à la leishmanine. Bien que la réactivité croisée entre toutes les souches de *Leishmania* soit complète, les antigènes hétérologues donnent souvent des réactions plus petites, et cela peut être la cause de difficulté dans la normalisation. Le test à la leishmanine est utilisé dans le diagnostic clinique de la CL et de la MCL. Dans la VL, elle mesure seulement des infections passées car une anergie complète est observée au cours de la maladie active. Les leishmanines ne sont plus disponibles commercialement.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

1. Vaccin

Il n'y a pas de vaccin efficace disponible pour l'immunisation prophylactique contre la leishmaniose. Jusqu'à présent, la seule vaccination fiable contre les *Leishmania* était limitée à la protection de l'homme contre *L. tropica* et *L. major*, par infection préalablement provoquée à la seringue avec des organismes *L. major*. Les promastigotes sont injectés dans le bras ou une autre partie du corps. Les promastigotes vivants utilisés doivent soit être fraîchement extraits de cultures, soit peuvent être conservés dans de l'azote liquide. L'infection suit un cours naturel et après guérison, l'individu est solidement immunisé contre une infection postérieure avec les deux espèces de *Leishmania*. Ce type d'immunisation a été pratiqué sur une échelle limitée dans des régions hyper-endémiques de CL (provoqué par *L. major*) en Israël, en Iran et dans l'ancienne URSS (42). *Leishmania major* provoque une protection croisée contre *L. tropica*, mais l'inverse n'est probablement pas vrai. Cependant, cette espèce ne peut pas être considérée totalement sans danger et ce type d'immunisation doit être réservé à des humains se déplaçant dans des zones à haut risque. D'ailleurs, il n'est pas bénéfique dans les zones fortement endémiques puisque des individus contractent l'infection longtemps avant que ce type de préparation ne confère une protection. Il faut approximativement 3 mois avant que l'immunité soit acquise. La normalisation et le contrôle qualité de tels vaccins, actuellement non disponibles, sont nécessaires.

À présent, un nombre de vaccins anti-leishmania prometteurs sont en développement (8, 12 16). Parmi les vaccins de première génération, la fraction riche en glycoprotéine de *L. donovani* connue comme le « le ligand fucose-mannose » (FML) développée au Brésil est le premier vaccin contre la CanL autorisé pour la mise sur le marché. Des études de terrain ont montré que cet antigène lorsqu'il est administré avec de la saponine QuilA comme adjuvant a conféré une protection des animaux contre la maladie clinique à 80 % (5) et également une bonne efficacité immunothérapeutique chez les chiens infectés (6). Des organismes *Leishmania* tués mélangés avec une faible concentration de BCG comme adjuvant ont été soumis à des essais de phase I-II et de phase III pour l'immunisation contre les *Leishmania* de la CL chez l'homme et contre la VL chez l'homme et le chien avec des résultats limités (32, 33).

Les vaccins de seconde génération, qui sont pour la plupart au stade de pré-développement, consistent en une *Leishmania* génétiquement modifiée incapable de produire la maladie, en molécules recombinées ou leurs ADN correspondant, ou en des organismes recombinés portant des gènes de *Leishmania* et exprimant les antigènes

du parasite. Un antigène chimère construit à partir de trois antigènes recombinés de *Leishmania* qui avaient été sélectionnés pour leur capacité à induire une réponse immunitaire cellulaire (connu sous le nom de Leish-111f), est entré en phase I des essais cliniques sur des volontaires sains en janvier 2003 (38). Le même antigène polyprotéique, administré avec une émulsion stable de lipide A monophosphorylé (MPL-SE) ou avec de l'Adjuprime comme adjuvants, n'a pas réussi à protéger des chiens contre une infection à *L. infantum* au cours d'un essai de phase III (17).

2. Antigènes pour le diagnostic immunologique

Ni les leishmania utilisées pour les épreuves cutanées, ni les antigènes habituellement employés dans le sérodiagnostic de la leishmaniose, ne sont normalisés au niveau international (l'antigène recombiné K39 qui est presque normalisé est protégé par un brevet et n'est pas largement disponible). Le test à la leishmanine est spécifique de groupe, mais pas spécifique d'espèce. Par ailleurs, la leishmanine préparée pour le diagnostic d'un type clinique de leishmaniose provoquerait le développement de l'hypersensibilité retardée vis-à-vis du même type et des autres types cliniques. De même, les réactions sérologiques croisées sont fréquentes entre les espèces de *Leishmania*.

a) Leishmanine

Le test à la leishmanine est décrit dans la Section B.3. Des tests de stérilité, sécurité et d'activité sont exigés pour les préparations de leishmanine.

b) Les antigènes pour les épreuves sérologiques

Des antigènes destinés à être commercialisés pour les épreuves IFI et ELISA ont été produits mais sont encore sous évaluation. La raison principale des résultats non-satisfaisants avec ces antigènes est la pauvre stabilité des antigènes de leishmania. Ils peuvent être obtenus dans le laboratoire par croissance d'une souche de *Leishmania* dans un milieu de culture approprié. Pour les épreuves d'IFI et de DAT, les antigènes particuliers brutes, i.e. promastigotes intacts, sont exigés, alors que pour l'ELISA, une forme soluble de l'antigène est nécessaire.

3. Gestion des semences

a) Caractéristiques de la semence

Les souches des espèces de *Leishmania* utilisées pour préparer les produits biologiques sont identifiées au niveau des espèces et sous-espèces par des tests d'identification appropriés donnés dans la Section B.1. Une fois que les organismes ont été isolés et établis dans le laboratoire, ils doivent être assignés à un code international (45, 50). Ce code doit consister en 4 éléments séparés par des traits obliques : (a) le type de l'hôte à partir duquel la souche a été isolée (M pour Mammifère et I pour insecte suivi par 3 lettres indiquant le nom générique de l'hôte) ; (b) le pays où l'isolement a été fait, indiqué par un code de 2 lettres ; (c) l'année de l'isolement indiquée par les deux derniers chiffres, et (d) le code du laboratoire original donné à l'isolat (par exemple, MHOM/IN/80/DD8). Les parasites doivent être indemnes d'organismes contaminants et doivent être capables de produire un produit conforme aux normes. Les souches de référence sont disponibles sur demande auprès des centres collaborateurs de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) à Madrid (Espagne), Montpellier (France) et Jérusalem (Israël). Une liste de centres d'identification a été publiée par l'OMS (50).

b) Méthode de culture

La souche du parasite utilisée pour la préparation de la leishmanine doit être capable de produire un produit conforme aux normes nationales et internationales. Elle doit être sans ingrédient provoquant des réactions toxiques ou allergiques. Il n'y a pas d'antigène spécifique simple normalisé pour l'utilisation dans les épreuves de sérodiagnostic, mais quand ces antigènes sont préparés dans le laboratoire, ils doivent être normalisés pour leur sensibilité selon les exigences. Pour la préparation de la leishmanine aussi bien que pour les antigènes du sérodiagnostic, les organismes doivent être cultivés dans un milieu de culture approprié (tel que ceux recommandés dans la Section B.1. pour l'isolement des *Leishmania* et la culture en masse). Normalement, une bonne croissance des parasites est obtenue 7 jours après l'inoculation, et des soins doivent être pris pour que le stock de leishmania ne soit pas perdu par l'envahissement des flagelles, qui peut avoir lieu après approximativement 10 jours.

c) Cryoconservation

Les cultures et tissus de promastigotes infectés par des amastigotes peuvent être facilement conservés à l'état vivant à basses températures. Les deux formes peuvent être cryoconservées pendant des années à basses températures dans des congélateurs (-70°C), dans des containers solides en dioxyde de carbone (-76°C) ou dans des containers à azote liquide (-196°C) (45). Un cryoprotecteur est requis : du glycérol, pour donner une concentration finale de 7,5 à 10 %, ou du diméthyl sulphoxide (DMSO), à une concentration finale de 5 à 7,5 %. Les échantillons cryoprotégés sont transférés dans des containers stériles dans lesquels ils sont congelés. Ceux-ci peuvent être des tubes à congélation en plastique de 2 ml avec des capsules à vis hermétiques, en verre dur, des ampoules scellées par la chaleur, ou des tubes capillaires en verres ou plastiques. Une vitesse de refroidissement lente (approximativement de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) est indispensable pour la cryoconservation des leishmania. Ceci peut être obtenu par refroidissement des échantillons à 4°C et en les gardant à cette température pendant au minimum 1 h ; par la suite, ils sont transférés dans un congélateur à -20°C et laissés pendant 24 h ; puis déplacés dans un congélateur à -70°C pendant au moins 24 h de nouveau. Ils peuvent être stockés de façon permanente à cette température, ou bien transférés dans de l'azote liquide ou du dioxyde de carbone solide. Si possible, une unité de congélation programmable doit être utilisée. Quand du matériel cryoconservé est nécessaire, l'échantillon est prélevé et décongelé rapidement dans un bain d'eau à 37°C .

d) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Les cultures pour la leishmanine ou les antigènes du sérodiagnostic doivent être vérifiées pour la stérilité avant utilisation. La leishmanine est stockée à 4°C et les antigènes pour le sérodiagnostic à -20°C ou -70°C jusqu'à la date prescrite. Ces derniers doivent être reconstitués avec du PBS, pH 7,2, avant utilisation. Les cultures de leishmania viables peuvent être gardées à -70°C pendant 3 à 4 ans ou à -196°C indéfiniment. En raison de la non viabilité des vaccins appropriés, il n'a pas été possible de valider les agents immunisants développés actuellement. Les promastigotes vivants ou atténués de *L. major* utilisés dans certaines régions sont loin d'être satisfaisants. La leishmanine doit être testée pour l'allergie chez les cobayes avant utilisation. Les antigènes pour le sérodiagnostic doivent être testés pour leur efficacité et leur sensibilité par une normalisation correcte et en fonction de l'épreuve. Si un lot d'antigène n'a pas été utilisé pendant longtemps, il doit être revérifié avant d'être utilisé dans l'épreuve.

4. Méthode de fabrication

Comme les antigènes d'immunodiagnostic normalisés ne sont pas disponibles commercialement, Il faut les préparer dans le laboratoire. Les employés du laboratoire courant un risque d'infection surtout par injection, des précautions de sécurité biologiques appropriées sont donc essentielles pour minimiser ces risques (voir le Chapitre 1.1.2., « La biosécurité au laboratoire de microbiologie vétérinaire »).

a) Leishmanine

Les espèces de *Leishmania* sont développées, de préférence dans des milieux liquides sans sang tel que le milieu Drosophila de Schneider et le milieu RPMI (Rosewell Park Memorial Institute), pour éviter la contamination des antigènes du sang. Les promastigotes sont récoltés durant la phase logarithmique, lavés 4 fois dans une solution sans pyrogène à 1 000 g pendant 15 min, et resuspendu dans une solution sans pyrogène contenant 0,5 % de phénol (w/v) pour obtenir une concentration finale de $0,5-1 \times 10^7/\text{ml}$. La leishmanine peut aussi être fabriquée avec des promastigotes détruits obtenus comme ci-dessus et ultrasonnés. Le filtrat est ajusté à une concentration de protéine finale de 250 µg/ml avec une solution saline sans pyrogène contenant du Tween 80 (0,0005 % [v/v]) et du phénol (0,28 % [w/v]).

b) Les antigènes pour les épreuves sérologiques

Les méthodes de préparation des antigènes pour les multiples épreuves sont données dans la Section B.2.

5. Contrôles en cours de fabrication

Un ou plusieurs lots de leishmanine doivent être testés chez les cobayes pour le test allergique. La sensibilité et la spécificité de la leishmanine doivent être déterminées de préférence par la réalisation du test chez des modèles animaux appropriés (souris différentes selon les espèces de leishmania) ou chez des patients qui sont remis des infections à leishmania, et chez une population témoin non exposée.

6. Contrôles des lots

L'OMS a proposé un guide pour la production de la leishmanine (48, 49). Il est recommandé que la source du matériel soit contrôlée par analyse utilisant les isoenzymes pour typer les souches de *Leishmania* utilisées dans la préparation de la leishmanine.

a) Stérilité

Chaque lot à conditionner doit être testé pour la stérilité bactérienne et mycosique selon l'OMS (47). L'absence de leishmania vivante est vérifiée par inoculation d'un échantillon de chaque lot dans un milieu gélose sang approprié, qui est ensuite incubé à 23 °C pendant au moins 15 jours. Un échantillon est injecté par voie intradermique (pour les leishmania dermatropes) ou par voie intrapéritonéale (pour les leishmania viscerotropes) chez les souris ou les hamsters. Ces animaux sont observés pendant une période de 30 à 90 jours.

b) Innocuité

Les échantillons de chaque lot à conditionner doivent être testés pour une toxicité anormale par des tests appropriés chez des cobayes et des souris. Pour chaque lot, cinq souris pesant 17 à 22 g et deux cobayes pesant 250 à 350 g reçoivent une injection par voie sous-cutanée et par voie intrapéritonéale avec une dose humaine du produit. Les animaux sont alors observés pendant au moins 7 jours pour la mort ou les signes de la maladie.

c) Activité

La leishmanine est testée sur des modèles animaux (selon l'espèce de leishmania impliquée) qui ont été précédemment infectés avec la même souche que celle utilisée pour la production de leishmanine. Les lots d'au moins cinq animaux infectés et d'animaux témoins sont injectés par voie intradermique dans une des pattes postérieures avec 50 µl de leishmanine. Après 2 à 3 jours, tous les animaux infectés doivent montrer un épaississement significatif de la plante du pied comparés aux animaux témoins.

7. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir Section C.6.b

b) Activité

Voir Section C.6.c

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ASHFORD D.A., BADARO R., EULALIO C., FREIRE M., MIRANDA C., ZALIS M.G. & DAVID J.R. (1993). Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **48**, 1–8.
2. BADARO R., BENSON D., EULALIO M.C., FREIRE M., CUNHA S., NETTO E.M., PEDRAL-SAMPAIO D., MADUREIRA C., BURNS J.M., HOUGHTON R.L., DAVID J.R. & REED S.G. (1996). rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, **173**, 758–761.
3. BELL A.S. & RANFORD-CARTWRIGHT L.C. (2002). Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol.*, **18** (8), 337–342.
4. BOELAERT M., EL SAFI S., JACQUET D., DE MUYNCK A., VAN DER STUYFT P. & LE RAY D. (1999). Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**, 129–134.
5. BORJA-CABRERA G.P., CORREIA PONTES N.N., da SILVA V.O., PARAGUAI de SOUZA E., SANTOS W.R., GOMES E.M., LUZ K.G., PALATNIK M. & PALATNIK de SOUSA C.B. (2002). Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). *Vaccine*, **20**, 3277–3284.

6. BORJA-CABRERA G.P., CRUZ MENDES A., PARAGUAI de SOUZA E., HASHIMOTO OKADA L.Y., de A TRIVELLATO F.A., KAWASAKI J.K., COSTA A.C., REIS A.B., GENARO O., BATISTA L.M., PALATNIK M. & PALATNIK de SOUSA C.B. (2004). Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*, **22**, 2234–2243.
7. BOSSOLASCO S., GAIERA G., OLCINI D., GULLETTA M., MARTELLO L., BESTETTI A., BOSSI L., GERMAGNOLI L., LAZZARIN A., UBERTI-FOPPA C. & CINQUE P. (2003). Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **41** (11), 5080–5084.
8. BRANDONISIO O., FUMAROLA L., MAGGI P., CAVALIERE R., SPINELLI R. & PASTORE G. (2002). Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **21**, 461–464.
9. BULLE B., MILLON L., Bart J.M., GALLEGO M., GAMBARELLI F., PORTUS M., SCHNUR L., JAFFE C.L., FERNANDEZ-BARREDO S., ALUNDA J.M. & PIARROUX R. (2002). Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3391–3397.
10. CARDOSO L., SCHALLIG H.D., NETO F., KROON N. & RODRIGUES M. (2004). Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop.*, **91**, 95–100.
11. CARVALHO S.F., LEMOS E.M., COREY R. & DIETZE R. (2003). Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **68**, 321–324.
12. COLER R.N. & REED S.G. (2005). Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, **21**, 244–249.
13. DE BRUJIN M.H.L., LABRADA L.A., SMYTH A.J., SANTRIC C. & BARKER D.C. (1993). A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. *Trop. Med. Parasitol.*, **44**, 201–207.
14. EVANS D.A. (1987). *Leishmania*. In: *In-Vitro Methods for Parasite Cultivation*, Taylor A.E. & Baker J.R., eds. Academic Press, London, UK, 52–75.
15. FRANCINO O., ALTET L., SANCHEZ-ROBERT E., RODRIGUEZ A., SOLANO-GALLEGO L., ALBEROLA J., FERRER L., SANCHEZ A. & ROURA X. (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, **137** (3-4), 214–221.
16. GRADONI L. (2001). An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet. Parasitol.*, **100**, 87–103.
17. GRADONI L., FOGLIA MANZILLO V., PAGANO A., PIANTEDOSI D., DE LUNA R., GRAMICCIA M., SCALONE A., DI MUCCIO T. & OLIVA G. (2005). Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*, (in press).
18. GRADONI L., SCALONE A. & GRAMICCIA M. (1993). HIV-*Leishmania* co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **87**, 94–96.
19. GRAMICCIA M., SMITH D.F., ANGELICI M.C., READY P.D. & GRADONI L. (1992). A kinetoplast probe diagnostic for *Leishmanis infantum*. *Parasitology*, **107**, 509–517.
20. GRIMALDI G. & McMAHON-PRATT D. (1996). Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **91**, 37–42.
21. HARITH A.E., KOLK A.H.J., LEEUWENBURGH J., MUIGAI R., HUIGEN E., JELSMA T. & KAGER P.A. (1988). Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 1321–1325.
22. HARITH A.E., SLAPPENDEL R.J., REITER I., VAN KNAPEN F., KORTE P.D., HUIGEN E. & KOLK A.H.J. (1989). Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leshmania* antibodies in the canine reservoir. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 2252–2257.

23. HART D.T. (1989). Leishmaniosis. The Current Status and New Strategies for Control. NATO ASI Series. Ser. A: Life Sciences, Vol. 163. Plenum Press, New York, USA, 1041 pp.
24. HOUGHTON R.L., PETRESCU M., BENSON D.R., SKEIKY Y.A.W., SCALONE A., BADARO R., REED S.G. & GRADONI L. (1998). A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *J. Infect. Dis.*, **177**, 1339–1344.
25. MAARTEN H.L., DE BRUIJN M.H.L. & BARKER D.C. (1992). Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.*, **52**, 45–58.
26. MANCIANTI F., FALCONE M.L., GIANNELLI C. & POLI A. (1995). Comparison between and enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, **59**, 13–21.
27. MANSON-BAHR P.C. (1987). Diagnosis. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol. II. Clinical Aspects and Control, Peters W. & Killick-Kendrick R., eds. Academic Press, London, UK, 703–729.
28. MATHIS A & DEPLAZES P. (1995). PCR and *in vitro* cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 1145–1149.
29. MAURICIO I.L., STOTHARD J.R. & MILES M.A. (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today*, **16**, 188–189.
30. MINODIER P., PIARROUX R., GAMBARELLI F., JOBLET C. & DUMON H. (1997). Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2551–2555.
31. MOHEBALI M., HAJJARAN H., HAMZAVI Y., MOBEDI I., ARSHI S., ZAREI Z., AKHOUNDI B., NAEINI K.M., AVIZEH R. & FAKHAR M. (2005). Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Vet. Parasitol.*, **129**, 243–251.
32. MOHEBALI M., KHAMESIPOUR A., MOBEDI I., ZAREI Z. & HASHEMI-FESHARKI R. (2004). Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. *Vaccine*, **22**, 4097–4100.
33. MOMENI A.Z., JALAYER T., EMAMJOMEH M., KHAMESIPOUR A., ZICKER F., GHASSEMI R.L., DOWLATI Y., SHARIFI I., AMINJAVAHARI M., SHAFIEI A., ALIMOHAMMADIAN M.H., HASHEMI-FESHARKI R., NASSERI K., GODAL T., SMITH P.G. & MODABBER F. (1999). A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine*, **17**, 466–472.
34. OTRANTO D., PARADIES P., SASANELLI M., LEONE N., de CAPRARIIS D., CHIRICO J., SPINELLI R., CAPELLI G. & BRANDONISIO O. (2005). Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 32–37.
35. OZBEL Y., OSKAM L., OZENSOY S., TURGAY N., ALKAN M.Z., JAFFE C.L. & OZCEL M.A. (2000). A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Trop.*, **74**, 1–6.
36. PIARROUX R., AZAIEZ R., LOSSI A.M., REYNIER P., MUSCATELLI F., GAMBARELLI F., FONTES M., DUMON H. & QUILICI M. (1993). Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence for *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniosis polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**, 364–369.
37. QUINNELL R.J., COURTENAY O., DAVIDSON S., GARCEZ L., LAMBSON B., RAMOS P., SHAW J.J., SHAW M.A. & DYE C. (2001). Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*, **122**, 253–261.
38. REED S.G. & CAMPOS-NETO A. (2003). Vaccines for parasitic and bacterial diseases. *Curr. Opin. Immunol.*, **15**, 456–460.
39. RIOUX, J.A. LANOTTE G., SERRES E., PRATLONG F., BASTIEN P. & PERIERES J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*, use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **65**, 111–125.

40. RYAN J.A., ARANA B.A., RYAN J.R., WIRTZ R.A., WORTMANN G.W. & RIZZO N.R. (2003). The domestic dog, a potential reservoir for *Leishmania* in the Peten region of Guatemala. *Vet. Parasitol.*, **115**, 1–7.
41. SCALONE A., DE LUNA R., OLIVA G., BALDI L., SATTÀ G., VESCO G., MIGNONE W., TURILLI C., MONDESIRE R.R., SIMPSON D., DONOGHUE A.R., FRANK G.R. & GRADONI L. (2002). Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.*, **104**, 275–285.
42. SHUIKINA E.E., SERGIEV V.P., TRIERS I.I., SHCHERBAKOV V.A. & DIVEEV S.KH. (1968). Experience of antileishmaniasis vaccination with cultures of *Leishmania tropica major* grown in various types of media. *Med. Parazitol. (Mosk.)*, **37**, 648–651 (in Russian).
43. SUNDAR S., SAHU M., MEHTA H., GUPTA A., KOHLI U., RAI M., BERMAN J.D. & MURRAY H.W. (2002). Noninvasive management of Indian visceral leishmaniasis: clinical application of diagnosis by K39 antigen strip testing at a kala-azar referral unit. *Clin. Infect. Dis.*, **35**, 581–586.
44. UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME/WORLD BANK/WORLD HEALTH ORGANIZATION (1985). Characterization of *Leishmania* spp. by DNA Hybridization Probes. A Laboratory Manual, D.C. Barker, ed. WHO, Geneva, Switzerland, 1–57.
45. UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME/WORLD BANK/WORLD HEALTH ORGANIZATION (1989). Handbook on Isolation, Characterization and Cryopreservation of *Leishmania*, Evans D., ed. WHO, Geneva, Switzerland, 1–45, pp.
46. VOLPINI A.C., PASSOS V.M., OLIVEIRA G.C. & ROMANHA A.J. (2004). PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.*, **90**, 31–37.
47. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1972). General Requirements for Sterility of Biological Substances. Technical Report Series 530. WHO, Geneva, Switzerland [amendments are available at www.who.int]
48. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1982). Report of the Fourth Meeting of the Scientific Working Group on Immunology of Leishmaniasis. TDR/LEISH SWG(4)/82.3.
49. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1985). Proposed Requirements for Tuberculins. WHO/BS/85.1463 Rev. 1.
50. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1990). Control of leishmaniasis. Technical Report Series 793. WHO, Geneva, Switzerland, 1–158.

*
* *

LEPTOSPIROSE

RÉSUMÉ

*La Leptospirose est une maladie transmissible des animaux et de l'homme causée par l'infection par certains membres pathogènes du genre *Leptospira*. Le diagnostic de laboratoire de la leptospirose peut être complexe et implique des épreuves qui se rassemblent en deux groupes. Un groupe d'épreuves est conçu pour détecter les anticorps anti-leptospire et l'autre groupe est conçu pour détecter les leptospires, les antigènes de leptospire, ou l'acide nucléique de leptospire dans les tissus animaux ou les fluides de l'organisme. Le régime de l'épreuve particulière sélectionnée dépend de l'emploi prévu de l'épreuve (ex. études de troupeaux ou dosage individuel chez l'animal) et des épreuves ou expertises disponibles dans la région.*

Identification de l'agent pathogène : *l'isolement ou la démonstration des leptospires dans :*

- a) les organes internes (tel que le foie, le poumon, la cervelle et le rein) et les fluides de l'organisme (sang, lait, liquide cébrospinal, thoracique et péritonéal) des animaux infectés cliniquement donne un diagnostic définitif d'une maladie clinique aiguë ou, dans le cas d'un fœtus, une infection chronique de la mère.*
- b) le rein, l'urine, ou le tractus génital des animaux sans signes cliniques diagnostique seulement un état de porteur chronique.*

L'isolement des leptospires à partir des prélèvements cliniques et l'identification des isolats sont longs et faits par des laboratoires de référence spécialisés. L'isolement suivi du typage à partir de porteurs rénaux est important et très utile dans les études épidémiologiques pour déterminer quels sérovars sont présents dans un groupe d'animaux particulier, une espèce animale, ou une région géographique.

La mise en évidence des leptospiroses par épreuves immunochimiques (immunofluorescence et immunohistochimie) est plus appropriée à la plupart des situations des laboratoires. Cependant, l'efficacité de ces épreuves dépend du nombre d'organismes présents dans les tissus, et ces épreuves n'ont pas la sensibilité de la culture. À moins que des réactifs préparés spécialement soient utilisés, les épreuves immunochimiques n'identifient pas le sérovar infectant et les résultats doivent être interprétés conjointement avec les résultats sérologiques. Les réactifs pour l'immunofluorescence sont meilleurs lorsqu'ils sont préparés avec des sérums anti-leptospire ayant un titre élevé en IgG, (non disponibles commercialement). Un sérum de lapin pour typage de leptospire ou des anticorps monoclonaux peuvent être utilisés pour l'immunohistochimie et sont disponibles auprès des laboratoires de références des leptospires.

Le matériel génétique des leptospires peut être mis en évidence dans les tissus ou les fluides de l'organisme en utilisant une variété de tests basés sur des réactions d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), soit traditionnelles soit en temps réel. Les PCR sont sensibles mais les procédures de contrôle de la qualité et le traitement des échantillons sont essentiels pour que cette technique fonctionne correctement et doivent être ajustés aux tissus, fluides et espèces testés. Comme les épreuves immunochimiques, les PCR n'identifient pas le sérovar infectant.

Épreuves sérologiques : *l'épreuve sérologique est le moyen le plus couramment utilisé pour diagnostiquer la leptospirose, et le test d'agglutination microscopique (MAT) est l'épreuve sérologique de référence. Les antigènes sélectionnés pour utilisation dans le MAT comprennent des souches représentatives des sérogroupes réputés exister dans la région en question plus celles connues pour être maintenues ailleurs par l'espèce-hôte testé.*

Le MAT est utilisé comme test sur animaux individuels et comme épreuve de troupeau. Comme test individuel chez l'animal, le MAT est très utile pour diagnostiquer une infection aiguë : une augmentation de 4 fois du titre d'anticorps dans des paires de sérum (en phase aiguë et en phase de convalescence) a valeur diagnostique. Pour obtenir des informations utiles sur l'état de santé d'un troupeau animal, au moins 10 animaux, ou 10 % du troupeau (si ce nombre est plus grand que 10), doivent être testés et l'historique de la vaccination des animaux doit être réalisé et documenté.

Le MAT a des limites dans le diagnostic de l'infection chronique chez des animaux isolés et dans le diagnostic des infections enzootiques dans les troupeaux. Les animaux infectés peuvent avorter ou être porteurs rénaux/génitaux avec des titres de MAT au dessous du titre significatif minimum largement accepté de 1/100 (dilution finale).

La méthode immuno-enzymatique (ELISA) peut aussi être utile pour la détection des anticorps contre les leptospires. De nombreux tests ont été développés et sont essentiellement utilisés pour la détection des infections récentes et le dépistage des animaux d'expérience pour l'utilisation dans des études expérimentales. Les animaux qui ont été vaccinés contre le sérovar intéressé peuvent être positifs avec certains ELISAs et ainsi compliquer l'interprétation des résultats.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : les vaccins pour l'usage vétérinaire sont le plus souvent des suspensions d'un ou plusieurs sérovars de *Leptospira* spp. inactivées de telle manière que l'activité immunogénique soit conservée. Tandis qu'une gamme de vaccins expérimentaux basés sur des extraits cellulaires ont été testés, des vaccins commerciaux, à quelques exceptions près, sont des produits cellulaires entiers. Les leptospires sont développés dans des milieux de culture appropriés, qui souvent contiennent du sérum ou des protéines sériques. S'ils sont utilisés, le sérum ou les protéines sériques sont éliminés du produit final. Les vaccins peuvent contenir des adjuvants appropriés.

A. INTRODUCTION

La leptospirose est une maladie transmissible des animaux et de l'homme causée par l'infection du spirochète *Leptospira*. Tous les leptospires pathogènes étaient classés autrefois comme membres de l'espèce *Leptospira interrogans*, cependant le genre a récemment été réorganisé et les leptospires pathogènes sont maintenant identifiées dans 17 espèces et 4 espèces génomiques (ou *genomospecies*) de *Leptospira* (14, 61, 71, 105). Il y a plus de 200 sérovars de leptospires distincts reconnus et ceux-ci sont regroupés dans 23 sérogroupes (52, 98).

L'utilisation, l'interprétation, et la valeur des procédures de diagnostic de laboratoire pour la leptospirose varient avec l'histoire clinique de l'animal ou du troupeau, la durée de l'infection, et le sérovar infectant. La leptospirose aiguë est suspectée dans les cas suivant : début soudain d'agalactie (chez la vache laitière et la brebis) ; ictère et hémoglobinurie, surtout chez les animaux jeunes ; méningite ; et incapacité rénale aiguë ou jaunisse chez les chiens. La leptospirose chronique est envisagée dans les cas suivants : avortement, mortinatalité, naissance de nouveau-nés fragiles (peut-être prématurés) ; infertilité ; incapacité rénale chronique ou hépatite chronique active chez le chien ; et cas d'ophtalmie périodique chez le cheval. Deux séquelles microbiologiques chroniques majeures de l'infection à leptospire présentent des problèmes de diagnostic particulier : la localisation et la persistance des leptospires dans le rein et dans le tractus génital du mâle et de la femelle. Les animaux infectés chroniquement peuvent rester porteurs pendant des années et servir de réservoirs de l'infection pour d'autres animaux et pour l'homme.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

La mise en évidence des leptospires dans le sang et le lait des animaux montrant des signes cliniques suggérant une leptospirose aiguë est considérée comme une confirmation du diagnostic. Cependant, l'isolement à partir du sang n'est pas souvent réussi parce que la bactériémie est transitoire et n'est pas toujours accompagnée par des signes cliniques. Les chiens sont souvent traités avec des antibiotiques avant que les échantillons ne soient collectés pour tester les *Leptospira*, ce qui diminue davantage la probabilité d'identifier l'agent dans le sang. La mise en évidence de l'infection généralisée à leptospires dans un éventail d'organes prélevés à l'autopsie est aussi considérée comme ayant valeur de diagnostic. Cependant, si l'animal vit assez longtemps ou a été traité avec des antibiotiques, il peut être difficile de détecter systématiquement des organismes intacts ; dans ces cas, l'immunohistochimie peut être particulièrement utile dans l'identification des antigènes de leptospires résiduels.

La mise en évidence des leptospires dans le tractus génital, les reins, ou l'urine seule doit être interprétée en prenant en considération les signes cliniques et les résultats sérologiques car ces résultats peuvent, aussi, simplement indiquer que l'animal était un porteur.

L'échec pour mettre en évidence les leptospires dans l'urine d'un animal n'élimine pas la possibilité que l'animal soit porteur rénal chronique ; il indique simplement que l'animal n'excrétait pas un nombre de leptospires détectable au moment du test. Le recueil de l'urine après traitement des animaux par un diurétique augmente les chances de détecter l'organisme (63). Dans des cas importants impliquant des animaux individuels (ex. empêcher un étalon de revenir dans l'élevage), des tests négatifs sur 3 échantillons d'urine consécutifs hebdomadaires sont considérés comme une bonne preuve qu'un animal n'élimine pas de leptospires dans l'urine.

La mise en évidence des leptospires dans les fluides corporels ou les organes internes (habituellement le rein, le foie, les poumons, le cerveau, ou les glandes surrénales) de fœtus mort-né ou avorté est le diagnostic d'une leptospirose chronique de la mère, et est la preuve d'une infection active du fœtus.

Réalisé par des personnes expérimentées, l'isolement des leptospires est la méthode la plus sensible pour démontrer leur présence, pourvu que les résidus d'antibiotiques soient absents, que l'autolyse des tissus ne soit pas avancée, que les tissus soient traités pour la culture rapidement après le recueil, et – dans le cas de l'urine – à pH convenable. Si les tissus ou fluides ne peuvent être transportés rapidement au laboratoire pour la culture des leptospires, l'échantillon sera conservé entre 2 et 5 °C pour prévenir l'envahissement par d'autres bactéries et l'autolyse des échantillons de tissu. Un milieu de culture liquide ou une solution de sérum-albumine bovine à 1 % (SAB) contenant du 5-fluorouracil à 100-200 µg/ml peuvent être utilisés comme milieu de transport pour la transmission des échantillons.

La culture est exécutée dans un milieu semi-solide (0,1 à 0,2 % de gélose) contenant soit de la SAB et du Tween 80 (ex. milieu Tween 80/SAB ou EMJH) (44) soit de la SAB et une combinaison de Tween 80 et de Tween 40 (30). La contamination peut être contrôlée par l'addition d'une variété d'agents sélectifs, ex. 5-fluorouracil (48), acide nalidixique (49), fosfomycine (64), et un mélange de rifamycine, polymyxine, néomycine, 5-fluorouracil, bacitracine, et actidione (1). Cependant, l'utilisation des agents sélectifs peut réduire les chances d'isolement quand il y a seulement un petit nombre de leptospires viables, et certaines souches de leptospires ne poussent pas dans un milieu sélectif contenant de multiples antibiotiques. L'addition de 0,4 à 1 % de sérum de lapin à un milieu de culture semi-solide, augmente les chances d'isolement de certains sérovars de leptospires à croissance lente.

Les cultures sont incubées à 29 ± 1 °C pendant au moins 16 semaines, et de préférence pendant 26 semaines (30). Le temps requis pour la détection d'une culture positive varie avec le sérovar de leptospire et le nombre d'organismes présents dans l'échantillon. Pour les sérovars à croissance plus rapide (ex. Pomona et Grippotyphosa), le résultat de la culture peut être positif dès 7 à 10 jours après inoculation ; pour d'autres sérovars (ex. Hardjo et Bratislava), cela peut prendre beaucoup plus longtemps. Les cultures sont examinées au microscope à fond noir toutes les 1 à 2 semaines. Il est important d'utiliser une source lumineuse de 100 W et un microscope à fond noir de bonne qualité.

Les leptospires peuvent aussi être mis en évidence par une variété de techniques de coloration immunochimique, ex. les techniques d'immunofluorescence (10, 31), et d'immunohistochimie variées (5, 33, 79, 81, 99, 106). Celles-ci sont utiles dans le diagnostic de l'infection à partir de matériel pathologique impropre à la culture ou quand un diagnostic rapide est requis. Comme le succès de ces techniques dépend du nombre d'organismes présents, elles sont moins appropriées pour le diagnostic de l'état de porteur chronique, où le nombre d'organismes peut être très faible ou localisé. Les leptospires ne se colorent pas de manière satisfaisante avec les colorants à l'aniline, et les techniques de coloration argentique manquent de sensibilité et de spécificité, bien qu'elles soient un complément utile pour le diagnostic histopathologique (7).

Les tests basés sur la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sont maintenant utilisés dans certains diagnostics et dans de nombreux laboratoires de référence pour la détection des leptospires dans les tissus et les fluides de l'organisme. Une variété de jeux d'amorces pour la conduite des tests de PCR ont été décrits (3, 6, 13, 37, 39, 44, 50, 51, 54, 59, 60, 66, 84, 93, 97, 103) avec des amorces spécifiques du genre *Leptospira* et d'autres destinées à l'identification des seuls espèces pathogènes. Ces épreuves n'identifient pas le sérovar en cause, bien que certaines paires d'amorces puissent permettre une identification plus poussée jusqu'au niveau de l'espèce ou du sérovar si les produits d'amplification de la PCR sont séquencés. Cette analyse complémentaire n'est pas une méthode de diagnostic de routine. De nombreuses paires d'amorces ont été préparées et évaluées pour être utilisées sur des échantillons d'origine humaine plutôt qu'animale ; un accord général quant aux amorces à utiliser sur les échantillons d'origine animale fait défaut. Chaque laboratoire est par conséquent responsable de la validation de l'épreuve particulière qu'il utilise sur les tissus, les liquides et les espèces à analyser. Les tests de PCR peuvent être très sensibles, mais le manque de spécificité (i.e. résultats faussement positifs) peut être un problème. La présence d'inhibiteurs de l'amplification dans les échantillons cliniques peut entraîner des résultats faussement négatifs, en particulier avec les échantillons d'origine animale dont l'utilisation peut être compromise par des fèces ou l'autolyse. Le contrôle qualité des tests de PCR utilisés

pour le diagnostic de la leptospirose requiert une attention particulière dans la conception du laboratoire et dans le flux du travail pour prévenir la contamination des réactifs, et l'utilisation d'échantillons témoins appropriés (29, 57). De plus, le traitement des échantillons pour la PCR est essentiel et doit être adapté aux tissus, fluides, et aux espèces testées. Un procédé pour la préparation des échantillons d'urine pour la PCR utilisant des billes magnétiques recouvertes d'un anticorps anti-leptospire est prometteur en augmentant la détection des leptospires pathogènes dans l'urine (88).

L'identification des isolats de leptospirose est une tâche pour les laboratoires de référence spécialisés. Pour une identification complète, une combinaison de procédures est utilisée pour déterminer : 1) si l'isolat est pathogène ou saprophyte ; 2) l'espèce de leptospires auquel l'isolat appartient ; et 3) le sérotype et le sérovar de l'isolat. Une culture de leptospire pure peut être identifiée comme appartenant à une espèce pathogène ou saprophyte par une variété de tests : la capacité à infecter les animaux ; la résistance relative à la 8-azaguanine ; l'activité de la lipase ; la tolérance à la température et au sel (46, 47) ; l'amplification basée sur les tests PCR de l'ADNr 23S (102) ; et le contenu G+C de l'ADN (46).

Les nouvelles espèces de leptospires ont été identifiées sur la base de l'analyse de l'hybridation ADN-ADN (14, 71, 105). Dans la plupart des cas, la souche type pour chaque sérovar était utilisée dans ces analyses ; pour quelques sérovats, les isolats cliniques ont aussi été testés pour déterminer les désignations des nouvelles espèces génomiques. Des isolats différents appartenant à un seul sérovar appartiennent habituellement à la même espèce, mais ceci n'est pas toujours le cas. L'identification des espèces des isolats de terrain est encore inconfortable, mais elle peut être faite par analyse séquentielle de l'ADNr 16S, par l'analyse génétique des gènes ARN ribosomiaux 16S ou 23S (17, 53, 61, 68, 70, 100, 101), par le typage de séquences multilocus (4,77), par séquençage du gène codant la sous-unité B de l'ADN gyrase (82) ou par PCR en utilisant la paire d'amorces spécifiques de *ompL1* (73).

Les souches appartenant au genre *Leptospira* peuvent être différenciées au niveau du sérotype par des réactions d'agglutination croisées (28). En outre la différenciation au niveau des sérovats était traditionnellement faite par absorption des agglutinations croisées, bien que pour la plupart des isolats ceci se fasse maintenant en utilisant des méthodes moins longues : l'analyse de facteurs (28), les anticorps monoclonaux (AcM) (89, 90), l'analyse des endonucléases de restriction (43, 56, 91, 92), et des stratégies de PCR variées (17, 21, 26, 38, 61, 69, 70, 72, 75, 77, 78, 82, 83, 107, 108). Cependant, les épreuves basées sur la génétique peuvent ne pas toujours donner les mêmes résultats que l'épreuve d'absorption de l'agglutination croisée.

2. Épreuves sérologiques

La sérologie est le procédé de laboratoire le plus fréquemment utilisé pour confirmer le diagnostic clinique, pour déterminer la prévalence dans un troupeau, et pour conduire des études épidémiologiques. Les anticorps anti-leptospire apparaissent quelques jours après le début de la maladie et persistent des semaines ou des mois et, dans certains cas, des années. Malheureusement, les titres d'anticorps peuvent tomber à des niveaux indétectables, alors que les animaux restent infectés chroniquement. Pour vaincre ce problème, des méthodes sensibles sont nécessaires pour détecter l'organisme dans l'urine ou le tractus génital des porteurs chroniques.

Une grande variété d'épreuves sérologiques, qui montre des degrés variés de spécificité de sérotypes et de sérovats, a été décrite. Deux épreuves ont un rôle dans le diagnostic vétérinaire : l'épreuve d'agglutination microscopique (MAT) et l'épreuve immuno-enzymatique (ELISA).

a) Épreuve d'agglutination microscopique

Le MAT qui utilise des antigènes vivants est l'épreuve sérologique la plus largement utilisée. C'est l'épreuve de référence contre laquelle toutes les autres épreuves sérologiques sont évaluées et elle est utilisée pour les épreuves d'importation/exportation. Pour une sensibilité optimale, il faut utiliser des antigènes représentatifs de tous les sérotypes connus existant dans la région dans laquelle les animaux vivent ainsi que, de préférence, des souches représentant tous les sérotypes connus. La présence d'un sérotype est habituellement indiquée par une réaction fréquente dans le dépistage sérologique mais il ne peut être identifié de façon définitive que par l'isolement d'un sérovar à partir d'un animal infecté cliniquement. La sensibilité de l'épreuve peut être améliorée par l'usage d'isolats locaux plutôt que par des souches de référence, mais les souches de référence aident à l'interprétation des résultats entre laboratoires.

La spécificité du MAT est bonne ; les anticorps contre d'autres bactéries ne donnent habituellement pas de réactions croisées avec *Leptospira* dans une large mesure. Cependant, il y a une réactivité sérologique croisée significative entre les sérovats et les sérotypes de *Leptospira*, et un animal infecté avec un sérovar aura probablement des anticorps contre le sérovar infectant qui croise avec d'autres sérovats (habituellement à un niveau plus bas) dans le MAT. La sérologie ne peut, par conséquent, identifier le sérovar infectant lors d'une infection individuelle ou lors d'un foyer – pour ce faire, il convient d'isoler l'agent pathogène. Cependant, dans les régions où les sérovats de *Leptospira* présents ont été isolés et décrits, une épreuve sérologique de l'animal (ou des animaux) infecté(s) peut suggérer de quel sérovar il s'agit,

sans toutefois l'identifier de façon définitive. De plus, les animaux qui ont été vaccinés contre la leptospirose peuvent avoir des anticorps contre les sérovars présents dans le vaccin utilisé. Il est donc particulièrement important d'envisager l'histoire de la vaccination des animaux testés. Les deux méthodes pour l'exécution de l'épreuve ont été décrites en détails (36, 62).

Les souches sélectionnées doivent être cultivées dans un milieu liquide pur culture pour leptospires (par ex. EMJH, SAB Tween 80 ou tout autre milieu approprié) à 29 ± 1 °C et la culture doit avoir au moins 4 jours, mais moins de 8 jours. Les cultures viables avec des densités de l'ordre de 2×10^8 leptospires/ml sont utilisées comme antigènes. La densité de la culture peut être calculée par numération bactérienne dans une cellule de comptage observée au microscope à fond noir. Une autre méthode pour estimer le nombre de bactéries consiste à mesurer la transmission dans un spectrophotomètre muni d'un filtre de 400 nm ou par néphélométrie. Si des méthodes indirectes sont utilisées, l'estimation du nombre des bactéries par comptage direct devra être corrélée avec celle obtenu par l'appareil utilisé. Le nombre d'antigènes utilisés est déterminé et une épreuve de dépistage peut être réalisée avec une dilution de sérum au 1/50 (ou une dilution de départ différente basée sur les besoins de l'épreuve). Un volume de chaque antigène, égal au volume du sérum dilué, est additionné à chaque puits, donnant la dilution finale du sérum de 1/100 dans l'épreuve de dépistage. Les plaques de microtitrage sont incubées à 29 ± 1 °C pendant 2 à 4 h. Les plaques sont examinées avec un microscope à fond noir.

La dilution finale est définie comme la dilution du sérum qui donne 50 % d'agglutination, laissant 50 % des bactéries libres, en comparaison avec une culture témoin diluée au 1/2 dans du tampon phosphate. Le résultat de l'épreuve est enregistré soit comme la dilution finale de sérum (par ex. 1/100 ou 1/400), soit sous forme du titre qui est l'inverse de la dilution (par ex. 100 ou 400). De nombreux laboratoires réalisent un criblage des sérums à la dilution de 1/100 et recommencent l'épreuve avec les sérums dont le titre est ≥ 100 afin de déterminer la dilution finale en diluant les sérums de 2 en 2, soit de 1/100 à 1/12 800 ou plus.

L'identité des antigènes est un facteur crucial dans la conduite de MAT. Les antigènes doivent être évalués pour leur identité, en utilisant des sérums de lapin hyperimmuns, des AcMs, ou une méthode moléculaire qui confirme les passages dans le temps, de préférence chaque fois que l'épreuve est en cours, mais au moins 2 fois par an. Le sérum de lapin hyperimmun pour ce propos peut être obtenu auprès d'un laboratoire de référence ou préparé en utilisant un protocole tel que celui donné par le Sous-Comité sur la Taxonomie des *Leptospira* (45). Brièvement, des lapins sains pesant 3 à 4 kg qui n'ont pas d'anticorps anti-leptospire détectables sont sélectionnés. Chaque lapin reçoit une injection intraveineuse dans une veine marginale de l'oreille avec une culture clonée traitée au formol ou vivante bien développée ayant approximativement une densité de 2×10^8 leptospirose/ml. La culture doit croître dans un milieu SAB Tween 80 ou un autre milieu approprié. 5 injections de 1 ml, 2 ml, 4 ml, 6 ml, et de nouveau 6 ml sont faites à 7 jours d'intervalle. Une semaine après l'injection finale, le titre d'anticorps homologue est déterminé par MAT. Si le titre est $\geq 1/12\ 800$, le lapin est anesthésié et saigné par ponction cardiaque 7 jours plus tard (i.e. 14 jours après l'injection finale). Si le titre est $< 1/12\ 800$, une injection supplémentaire de 6 ml de culture peut être faite ; 7 jours après cette injection le titre homologue est à nouveau déterminé. À moins que le titre soit $\geq 1/12\ 800$, le procédé doit être répété avec un autre lapin. Deux lapins sont utilisés pour préparer chaque antisérum. Si les titres sont satisfaisants chez les deux lapins, les sérums peuvent être réunis. Pour préserver l'activité, il est préférable de lyophiliser l'antisérum sous des volumes de 2 ml et de le stocker entre 2 et 5 °C. Alternativement, le sérum peut être stocké sous 2 ml entre -15 °C et -20 °C. Toutes les inoculations aux animaux doivent être réalisées selon les normes pour le bien être animal. D'autres protocoles d'immunisation peuvent être suivis selon l'usage envisagé pour les antisérums.

La pureté des antigènes utilisés dans le MAT doit être vérifiée régulièrement par culture sur gélose au sang et dans un bouillon thioglycolate. Les cultures disponibles des antigènes peuvent être stockées entre -70 °C et -80 °C ou dans l'azote liquide. Il peut y avoir un nombre faible de leptospires survivants après lyophilisation. Les passages répétés des antigènes en milieu liquide aboutissent à une perte d'antigénicité. Dans ce cas, une nouvelle culture liquide devra être tirée de la culture stockée.

En tant qu'épreuve de diagnostic individuel, le MAT est très utile pour le diagnostic des infections aiguës ; la mise en évidence d'une augmentation de 4 dilutions du titre en anticorps dans deux sérums prélevés en phase aiguë et en phase de convalescence a une valeur diagnostique. En outre, un diagnostic de leptospirose peut être posé si des titres élevés sont trouvés chez un animal conjointement avec un tableau clinique correspondant. L'épreuve connaît des limites dans le diagnostic de l'infection chronique chez des animaux individuels, à la fois dans le diagnostic d'avortement (32) et dans l'identification des porteurs génitaux ou rénaux (30). Ceci est particulièrement vrai avec les infections à leptospire adapté à l'hôte, par ex. infection par le sérovar Hardjo chez les bovins ; quand un titre de 1/100 ou plus est considéré comme significatif, la sensibilité de l'épreuve est seulement de 41 % et même quand le titre significatif minimum est réduit à 1/10, la sensibilité de l'épreuve est seulement de 67 % (30). La mise en évidence des anticorps dans le sang fœtal assure le diagnostic mais, en général, les titres sont très faibles (par ex. 1/10), ce qui implique que la plupart des laboratoires utilisent des procédures modifiées pour l'analyse.

Etant donné que la leptospirose est un problème de troupeau, le MAT a un emploi beaucoup plus important comme épreuve de troupeau. Pour obtenir une information utile, Cole *et al.* (20) suggèrent que des échantillons soient pris sur au moins 10 animaux, ou 10 % du troupeau (selon le nombre le plus élevé). Dans une étude de l'infection à Hardjo chez les bovins, Hathaway *et al.* (42) ont trouvé qu'un échantillon de 10 vaches indiquait habituellement la présence ou l'absence de l'infection dans un troupeau. L'augmentation notable de la taille des échantillons a amélioré l'information épidémiologique, les investigations de la maladie clinique, et le suivi de la santé publique.

Lors de la réalisation d'un diagnostic sérologique de leptospiroses, le sérovar infectant et la situation clinique impliqués doivent être pleinement considérés. Dans le cas du sérovar Pomona provoquant des avortements chez les bovins, un titre élevé est couramment trouvé au moment de l'avortement parce que l'épisode clinique a lieu peu de temps après la contamination. L'avortement chez les bovins dû au sérovar Hardjo survient en cas d'affection chronique ; dans ce cas, la réponse sérologique au moment de l'avortement est plus variable, avec des animaux séronégatifs et d'autres avec des titres élevés. Les bovins peuvent présenter une baisse de la production de lait pendant la phase aiguë de l'infection à Hardjo et ce signe clinique est associé à des titres élevés. L'histoire de la vaccination doit aussi être considérée dans l'interprétation des résultats de MAT car une vaccination importante contribue significativement au nombre d'animaux séropositifs et peut masquer la présence d'infections chroniques dans le troupeau particulièrement avec le sérovar Hardjo.

b) Méthode immuno-enzymatique

Des ELISA pour la détection des anticorps anti-leptospire ont été développés en utilisant des préparations d'antigènes différents, des protocoles d'essai et des plateformes d'essai, y compris les épreuves sur plaques et les épreuves sur bandelettes. Les données concernant les antigènes de surface de *Leptospira* ont été revues (25). En général, les ELISA sont assez sensibles, mais n'ont pas la spécificité du sérovar du MAT. Un ELISA qui mesure les IgG et les IgM canines contre des sérovars variés de leptospire a été développé et évalué en Europe (40, 41). L'IgM anti-leptospire est détectable par ce test moins d'une semaine après l'infection, avant que les anticorps agglutinant soient présents. Les anticorps IgG sont détectables chez les chiens infectés dès 2 semaines après l'infection et ils persistent pendant de longues périodes. Les chiens ayant une leptospirose aiguë ont donc des titres en IgM élevés et des titres en IgG relativement bas ; des chiens vaccinés ou qui ont eu des infections antérieures à leptospire ont des titres IgG élevés mais des titres IgM bas. Des épreuves similaires pour détecter des anticorps anti-leptospire bovin, porcin, et ovin ont été aussi développées (2, 19, 24, 58, 74, 85-87, 94, 104). Le rôle majeur de l'ELISA pour le bétail est l'utilisation d'un ELISA IgM pour la mise en évidence des infections récentes (24) et pour le dépistage des troupeaux dans les régions où la vaccination contre la leptospirose n'est pas pratiquée. Un ELISA Ig-total est utile dans l'identification des animaux sensibles en vue de travaux expérimentaux (34). Les ELISA ont aussi été développés pour l'utilisation sur le lait de vaches individuelles ou sur un lait de mélange pour la détection des anticorps du sérovar Hardjo. Ces épreuves ont été utiles dans l'identification des troupeaux infectés par Hardjo. Cependant, les troupeaux vaccinés contre le sérovar Hardjo seront aussi positifs dans ces différents ELISA diminuant leur utilisation dans les régions où la vaccination est pratiquée en routine. De nouveaux ELISA ont été développés basés sur la détection des anticorps dirigés contre les protéines de surface ou contre les lipoprotéines de *Leptospira* (12, 27, 55, 65, 67), mais ces tests ne sont pas encore aisément disponibles.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Les vaccins anti-leptospires pour usage vétérinaire sont des suspensions d'une ou plusieurs souches de *Leptospira* pathogènes de sorte que l'activité immunogénique soit conservée. Alors que des vaccins expérimentaux basés sur des extraits cellulaires ont été testés (9), des vaccins commerciaux sont, à quelques exceptions près, composés de cellules entières. Les leptospires sont cultivés dans des milieux de culture appropriés qui peuvent contenir du sérum ou des protéines sériques. Si du sérum ou des protéines sériques sont utilisés, ils doivent être éliminés du produit final. Les vaccins peuvent contenir des adjuvants appropriés.

Les lignes directrices pour la production des vaccins vétérinaires sont données dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont de nature générales et peuvent être additionnées par des exigences nationales et régionales.

1. Gestion des semences bactériennes

a) Caractéristiques de la semence bactérienne

La sélection proprement dite des souches pour la production du vaccin est de la plus grande importance. L'immunité induite par la vaccination est pour une grande part spécifique du sérovar (18). Un vaccin doit être formulé pour l'utilisation dans une espèce animale particulière et dans une région géographique particulière. Il doit contenir seulement les sérovars – et de préférence les génotypes – qui causent des problèmes dans l'espèce animale, ou qui sont transmises par les espèces animales à d'autres espèces dans la région. Les souches sélectionnées pour l'utilisation comme culture de semence principale doivent être clonées sur milieu solide pour s'assurer de l'absence de leptospires saprophytes contaminantes et de l'uniformité de la culture.

Les souches appropriées doivent en outre être sélectionnées pour leur haut rendement en culture dans les conditions de culture par lot.

b) Méthode de culture

Chaque souche composante incluse dans le vaccin final doit être cultivée séparément en milieu liquide ; de préférence dans un milieu libre de protéine (8, 80) ou pauvre en protéine (8).

Le volume de chaque culture de semence principale doit être multiplié par une croissance pendant 2 à 10 jours à $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ au cours d'une série de subcultures jusqu'à l'obtention d'un volume suffisant pour l'emploi comme culture de la production de semence. Les cultures doivent être aérées et agitées comme il est exigé.

Chaque subculture de la culture de semence principale doit être vérifiée pour sa pureté et pour une croissance satisfaisante. La pureté peut être vérifiée par inoculation d'une anse sur des géloses au sang ou dans un bouillon thioglycolate incubés entre $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 2 à 5 jours, et par examen d'un frottis coloré au Gram. La croissance peut être vérifiée au microscope à fond noir. Chaque culture de production de la semence doit aussi être vérifiée avec un antisérum de lapin homologue (28) pour s'assurer de la pureté et de l'homologie. Les AcMs peuvent aussi être utilisés dans ce but.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Il existe une vaste littérature décrivant l'efficacité des vaccins contre la leptospirose. Dans la plupart des cas, les vaccins fournissent une protection significative vis-à-vis de la maladie produite par expérience homologue dans les conditions du terrain.

Les vaccins sont moins efficaces en ce qui concerne la prévention de l'infection chez l'animal et un pourcentage d'animaux vaccinés deviendra infecté avec le sérovar approprié et pourra éliminer l'organisme dans l'urine en dépit d'un manque de signes cliniques de la maladie.

Les essais d'efficacité et la validation du vaccin doivent être conduits sur des espèces cible pour le vaccin. Le vaccin est administré comme il est recommandé sur l'étiquette, et l'immunité doit être testé lors d'une épreuve avec des souches virulentes de chaque sérovar du terrain ; épreuve réalisée par les voies naturelles de l'infection, *i.e.* par épreuve conjonctivale et/ou vaginale. Les études de validation ont souvent été conduites avec une épreuve de l'immunité par injection intraveineuse ou intramusculaire de leptospires. La protection apportée par les vaccins validés de cette façon n'a pas toujours été démontrée vis-à-vis des infections de terrain, qui ont lieu par exposition aux leptospires des muqueuses des yeux, de la bouche, et du tractus génital. Fait notable, par exemple : les vaccins anti-leptospire du commerce contenant le sérovar Hardjo n'ont pas toujours protégé les bovins d'infections de terrain ou par voie conjonctivale avec le sérovar Hardjo (11). Un projet de monographie pour évaluer l'efficacité vaccinale du sérotype Hardjo a été réalisé et il préconise l'utilisation de voies plus naturelles pour l'épreuve virulente (35).

2. Méthode de fabrication

La fabrication est effectuée par culture en lot dans des fermenteurs convenablement jaugés. Ceux-ci doivent être pourvus d'orifices pour l'addition stérile de culture, d'air, et de milieu additionnel. Ils doivent aussi avoir des orifices pour prise d'échantillons de sorte que la pureté et la croissance de la culture puissent être contrôlées.

Idéalement, les milieux sans protéine ou avec peu de protéine sont utilisés pour la production. Cependant, certaines souches exigent la présence de protéine animale pour réaliser un rendement convenable ; ceci est d'habitude fourni par la SAB. Tous les composants des milieux qui ne sont pas dégradés par la chaleur doivent

être stérilisés par la chaleur. Ceci réduit le risque de contamination par les leptospires saprophytes nées dans l'eau qui ne sont pas éliminées par la stérilisation par filtration.

Après addition de la semence, la croissance de la culture de production est contrôlée à intervalles fréquents au début de la croissance pendant la phase logarithmique. Une fois cela fait, le récipient est ensuite agité et aéré. Le rendement final peut souvent être amélioré par l'addition de plus de Tween 80 à la culture quand on observe que la croissance logarithmique est ralentie. Une croissance adéquate peut exiger plus de 10 jours d'incubation à $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

L'inactivation se fait d'habitude par addition de formol, mais le phénol, le merthiolate et l'inactivation par la chaleur ont aussi été utilisés.

Après une période d'inactivation appropriée, la culture peut être concentrée et le matériel protéique supplémentaire peut être éliminé par ultrafiltration. Des volumes appropriés des différents souches comprises dans le vaccin final peuvent ensuite être mélangés, et l'adjuvant et le préservatif additionnés, quand de besoin.

3. Contrôles en cours de fabrication

Pendant la production, tous les jours et même 2 fois par jour, des échantillons doivent être prélevés et contrôlés pour la croissance des leptospires et l'absence de contaminants. La croissance est contrôlée soit par comptage des leptospires dans une chambre de comptage sous microscope à fond noir soit à l'aide d'un néphélomètre. L'absence de contamination peut être contrôlée par l'examen microscopique des préparations de culture centrifugée colorées avec le Gram.

Immédiatement avant l'inactivation, un échantillon doit être prélevé pour vérification contre l'anticorps homologue dans un MAT. La culture inactivée doit être vérifiée pour l'absence de leptospires viables. Ceci est fait par inoculation d'aliqots de culture inactivée dans des milieux de culture appropriés, tel que le milieu de Johnson et Harris (47), incubé à $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 4 semaines, et examiné toutes les semaines avec un microscope à fond noir pour la présence de leptospires viables.

Après le mélange, les taux des agents inactivants libres, des minéraux présents dans les adjuvants (tel que l'alumine), et du conservateur (tel que le thiomersal) doivent rester compris dans les limites prescrites.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les échantillons sélectionnés du vaccin achevé doivent être testés pour l'absence de bactérie viable et de champignon (16, 22, 23, 95). Les tests pour la stérilité et l'absence de contamination des matériels biologiques peuvent être trouvés dans le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Les échantillons du produit achevé doivent être testés pour l'innocuité. Pour ce faire, les méthodes ont été décrites ailleurs (15, 22, 96). Le test doit être effectué pour chaque voie d'inoculation indiqué sur l'étiquette et chez deux animaux sains de chaque catégorie (par ex. animaux gestants, réserve de jeunes) pour lequel le vaccin est projeté. Les animaux doivent être sensibles aux sérovars utilisés dans le vaccin et leurs sérums ne doivent pas avoir d'anticorps agglutinant ces sérovars. Chaque animal reçoit une injection de vaccin par la voie recommandée avec 2 fois la dose recommandée, comme formulé sur l'étiquette. Les animaux sont observés pendant 14 jours et ne doivent pas présenter d'effets défavorables attribuables au vaccin.

c) Activité

Des échantillons de vaccin complet doivent être testés chez les hamsters ou les cobayes pour évaluer l'activité. Celle-ci est habituellement mesurée par la capacité du vaccin à prévenir la mort de l'animal quand il est soumis à une épreuve avec 10 et 10 000 DL_{50} (dose létale de 50 %). Pour certains sérovars qui ne sont pas létaux pour le hamster ou le cobaye, tel que le sérovar Hardjo, l'activité est mesurée par la prévention de l'infection rénale quand les animaux sont soumis à une épreuve avec une dose comprise entre 10 et 10 000 DI_{50} (dose infectieuse de 50 %) ou par l'induction d'un titre d'anticorps convenable chez le lapin.

Un exemple de protocole consiste à injecter 1/40 d'une dose de vaccin pour chien à 10 hamsters sains âgés de moins 3 mois. Après 15 à 30 jours, chaque hamster vacciné, et chacun des 10 hamsters non vaccinés du

même âge, reçoit une injection par voie intrapéritonéale d'une quantité convenable d'une culture virulente de leptospires du sérovar utilisé pour produire le vaccin (ou une suspension de tissu de rein ou de foie prélevé chez un animal infecté expérimentalement). Dans le cas d'un vaccin bivalent, chaque sérovar est testé séparément. Pour que le vaccin passe le test, au moins 8/10 des animaux vaccinés doivent rester en bonne santé pendant 14 jours après la mort des témoins. D'autres protocoles peuvent s'appliquer aux vaccins pour les bovins et les porcs qui contiennent jusqu'à 5 ou 6 composants.

Les tests d'activité *in vitro*, pour les vaccins anti-leptospire sont actuellement développés sur la base d'une quantification de l'antigène protecteur. Il s'agit d'une technique ELISA de capture utilisant des AcMs (76). Leur normalisation est en cours et est réalisée en utilisant des vaccins de référence en corrélation avec des données d'efficacité basées sur des tests d'activité sur hamster ou sur des tests anticorps et hôte-cible.

d) Durée de l'immunité

La durée de l'immunité doit être déterminée chez l'espèce animale à laquelle le vaccin est destiné en utilisant les voies naturelles de l'épreuve (11). La durée de l'immunité ne doit pas être estimée sur la base de la durée des titres en anticorps par le test MAT chez les animaux vaccinés car une protection contre la maladie clinique peut exister même avec des titres faibles. L'immunité vaccinale doit persister pendant au moins 6 mois ou plus longtemps selon le titre de l'étiquette.

e) Stabilité

Quand stocké dans les conditions prescrites, les vaccins peuvent vraisemblablement maintenir leur activité pendant 1 à 2 ans. La stabilité doit être évaluée par la détermination de l'activité après stockage entre 2 et 5 °C, à la température ambiante et entre 35 et 37 °C.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir Section C.4.b.

b) Activité

Voir Section C.4.c

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADLER B., FAINE S., CHRISTOPHER W.L. & CHAPPEL R.J. (1986). Development of an improved selective medium for isolation of leptospires from clinical material. *Vet. Microbiol.*, **12**, 377–381.
- ADLER B., FAINE S. & GORDON L.M. (1981). The enzyme-linked immunosorbent assay as a serological test for detecting antibodies against *Leptospira interrogans* serovar hardjo in sheep. *Aust. Vet. J.*, **57**, 414–417.
- ALT D.P., ZUERNER R.L. & BOLIN C.A. (2001). Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **219**, 636–639.
- AHMED N., MANJULATA DEVI S., VALVERDE M. DE LOS A., VIJAYACHARI P., MACHANG'U R.S., ELLIS W.A. & HARTSKEERL R.A. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, **5**, 28 (doi:10.1186/1476-0711-5-28).
- BARNETT J.K., BARNETT D., BOLIN C.A., SUMMERS T.A., WAGAR E., CHEVILLE N.F., HARTSKEERL R. & HAAKE D. (1999). Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect. Immun.*, **67**, 853–861.
- BAROCCHI M.A., KO A.I., FERRER S.R., FARIA M.T., REIS M.G. & RILEY L.W. (2001). Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar copenhageni and its application of PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 191–195.
- BASKERVILLE A. (1986). Histopathological aspects of diagnosis of leptospirosis. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.*, **36**, 33–43.
- BEY R.F. & JOHNSON R.C. (1978). Protein-free and low-protein media for the cultivation of *Leptospira*. *Infect. Immun.*, **19**, 562–569.

9. BEY R.F. & JOHNSON R.C. (1986). Current status of leptospiral vaccines. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.*, **2**, 175–197.
10. BOLIN C.A., ZUERNER R.L. & TRUEBA G. (1989). Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis in bovine urine. *Am. J. Vet. Res.*, **50**, 1001–1003.
11. BOLIN C.A., ZUERNER R.L. & TRUEBA G. (1989). Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis on type hardjo-bovis infection of cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **50**, 2004–2008.
12. BOMFIM M.R., KO A. & KOURY M.C. (2005). Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Vet. Microbiol.*, **109**, 89–94.
13. BRANGER C., BLANCHARD B., FILLONNEAU C., SUARD I., AVIAT F., CHEVALLIER B. & ANDRE-FONTAINE G. (2005). Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol. Lett.*, **243**, 437–445.
14. BRENNER J., KAUFMANN A.F., SULZER K.R., STEIGERWALT A.G., ROGERS F.C. & WEYANT R.S. (1999). Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 839–858.
15. BRITISH PHARMACOPOEIA (VETERINARY) (1985). *Leptospira* veterinary vaccines. 117.
16. BRITISH PHARMACOPOEIA (VETERINARY) (1985). Test for sterility of veterinary immunological products. Appendix xviA, (vet). 2, A127–A128.
17. BROWN P.D. & LEVETT P.N. (1997). Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. *J. Med. Microbiol.*, **46**, 173–181.
18. CHEN T.Z. (1986). Development and present status of leptospiral vaccine and technology of production of the vaccine in China. *Ann. Immunol. Hung.*, **26**, 125–151.
19. CHO H.J., GALE S.P., MASRI S.A. & MALKIN K.L. (1989). Diagnostic specificity, sensitivity and cross-reactivity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against *Leptospira interrogans* serovars pomona, sejroe and hardjo in cattle. *Can. J. Vet. Res.*, **53**, 285–289.
20. COLE J.R., ELLINGHAUSEN H.C. & RUBIN H.L. (1980). Laboratory diagnosis of leptospirosis of domestic animals. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, **83**, 189–199.
21. CORNEY B.G., COLLEY J., DJORDJEVIC S.P., WHITTINGTON R. & GRAHAM G.C. (1993). Rapid identification of some *Leptospira* isolates from cattle by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 2927–2932.
22. COUNCIL OF EUROPE (2002). Monograph 01/2002:0447: *Leptospira* vaccine for veterinary use. In: European Pharmacopoeia, Fourth Edition. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, p. 2270.
23. COUNCIL OF EUROPE (2002). Chapter 2. Methods of analysis. In: European Pharmacopoeia, Fourth Edition. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 13–231.
24. COUSINS D.V., ROBERTSON G.M. & HUSTAS L. (1985). The use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to *Leptospira interrogans* serovars hardjo, pomona and tarassovi in cattle. *Vet. Microbiol.*, **10**, 439–450.
25. CULLEN P.A., XU X., MATSUNAGA J., SANCHEZ Y., KO A.I., HAAKE D.A. & ADLER B. (2005). Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect. Immun.*, **73**, 4853–4863.
26. DE CABALLERO O.L., DIAS NETO E., KOURY M.C., ROMHANHA A.J. & SIMPSON A.J. (1994). Low-stringency PCR with diagnostically useful primers for identification of *Leptospira* serovars. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1369–1372.
27. DEY S., MOHAM C.M., KUMAR, T.M., RAMADASS P., MAINER A.M. & NACHIMUTHU K. (2004). Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. *Vet. Microbiol.*, **103**, 99–106.
28. DIKKEN H. & KMETY E. (1978). Serological typing methods of leptospires. *Methods Microbiol.*, **11**, 259–307.

29. DRAGON E.A., SPADORO J.P. & MADEJ R. (1993). Quality control of polymerase chain reaction. *In: Diagnostic Molecular Microbiology. Principals and Applications*, Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C. & White T.J., eds. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 160–168.
30. ELLIS W.A. (1986). The diagnosis of leptospirosis in farm animals. *In: The Present State of Leptospirosis Diagnosis and Control*, Ellis W.A. & Little T.W.A., eds. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, 13–31.
31. ELLIS W.A., O'BRIEN J.J., NEILL S.D., FERGUSON H.W. & HANNA J. (1982). Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in aborted cows. *Vet. Rec.*, **110**, 147–150.
32. ELLIS W.A., O'BRIEN J.J., NEILL S.D. & HANNA J. (1982). Bovine leptospirosis: Serological findings in aborting cows. *Vet. Rec.*, **110**, 178–180.
33. ELLIS T.M., ROBERTSON G.M., HUSTAS L. & KIRBY M. (1983). Detection of leptospires in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. *Aust. Vet. J.*, **60**, 364–367.
34. ELLIS W.A. & ZYGRAICH N. (1986). Experimental studies with a *Leptospira interrogans* serovar hardjo vaccine. Proceedings of the XIVth World Congress on Diseases of Cattle, Dublin, Eire, 971–974.
35. EUROPEAN PHARMACOPOEIA DRAFT MONOGRAPH; Bovine Leptospirosis vaccine (inactivated); PA/PH/Exp. 15V/T (01) 28.
36. FAINE S., ADLER B., BOLIN C. & PEROLAT P. (2000). *Leptospira* and Leptospirosis, Second Edition. Medisci Press, Melbourne, Australia.
37. GERRITSEN M.J., OLYHOEK T., SMITS M.A. & BOKHOUT B.A. (1991). Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative detection of *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjo-bovis in bovine urine. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2805–2808.
38. GERRITSEN M.A., SMITS M.A. & OLYHOEK T. (1995). Random amplified polymorphic DNA fingerprinting for rapid identification of leptospires of serogroup Sejroe. *J. Med. Microbiol.*, **42**, 336–339.
39. GRAVEKAMP C., VAN DE KAMP H., FRANZEN M., CARRINGTON D., SCHOONE G.J., VAN EYS G.J.J.M., EVERARD C.O.R., HARTSKEERL R.A. & TERPSTRA W.J. (1993). Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 1691–1700.
40. HARTMAN E.G., VAN DEN INGH T.S.G.A.M. & ROTHUIZEN J. (1986). Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM- and IgG-specific ELISA. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **13**, 261–271.
41. HARTMAN E.G., VAN HOUTEN M., FRIK J.F. & VAN DER DONK J.A. (1984). Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM- and IgG-specific ELISA. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **7**, 245–254.
42. HATHAWAY S.C., LITTLE T.W.A. & PRITCHARD D.G. (1986). Problems associated with the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in bovine populations. *Vet. Rec.*, **119**, 84–86.
43. HERRMANN J.L., BELLENGER E., PEROLAT P., BARANTON G. & SAINT GIRONS I. (1992). Pulsed-field gel electrophoresis of *notI* digests of leptospiral DNA—A new rapid method of serovar identification. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1696–1702.
44. HOOKEY J.V. (1992). Detection of Leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, **90**, 267–274.
45. INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (1984). Subcommittee on the taxonomy of *Leptospira*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**, 258–259.
46. JOHNSON R.C. & FAINE S. (1984). Leptospiraceae. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 62–67.
47. JOHNSON R.C. & HARRIS V.G. (1967). Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. *J. Bacteriol.*, **94**, 27–31.
48. JOHNSON R.C. & ROGERS P. (1964). 5-Fluorouracil as a selective agent for growth of Leptospirae. *J. Bacteriol.*, **87**, 422–426.

49. JOHNSON R.C. & SEITER C.W. (1977). The *Leptospira* and their cultivation – a monograph. Reheis Chemical (a division of Armour Pharmaceutical), Phoenix, Arizona, USA.
50. JOUGLARD S.D., SIMIONATTO S., SEIXAS F.K., NASSI F.L. & DELLAGOSTIN O.A. (2006). Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. *Can. J. Microbiol.*, **52**, 747–752.
51. KAWABATA H., DANCEL L.A., VILLANUEVA S.Y., YANAGIHARA Y., KOIZUMI N. & WATANABE H. (2001). *flab*-polymerase chain reaction (*flab*-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp. *Microbiol. Immunol.*, **45**, 491–496.
52. KMETY E. & DIKKEN H. (1993). Classification of the Species *Leptospira interrogans* and History of its Serovars. University Press, Groningen, The Netherlands.
53. LETOCART M., BARANTON G. & PEROLAT P. (1997). Rapid identification of pathogenic *Leptospira* species (*Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii*, and *L. kirschneri*) with species-specific DNA probes produced by arbitrarily primed PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 248–253.
54. LEVETT P.N., MOREY R.E., GALLOWAY R.L., TURNER D.E., STEIGERWAIT A.G. & MAYER L.W. (2005). Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J. Med. Microbiol.*, **54**, 45–49.
55. MARIYA R., CHAUDHARY P., KUMAR A.A., THANGAPANDIAN E., AMUTHA R. & SRIVASTAVA S.K. (2006). Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infec. Dis.*, **29**, 269–277.
56. MARSHALL R.B., WILTON B.E. & ROBINSON A.J. (1981). Identification of *Leptospira* serovars by restriction-endonuclease analysis. *J. Med. Microbiol.*, **14**, 163–166.
57. MCCREEDY B.J. & CALLAWAYTH H. (1993). Laboratory design and work flow. In: Diagnostic Molecular Microbiology. Principals and Applications, Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C. & White T.J., eds. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA, 149–159.
58. MENDOZA L. & PRESCOTT J.F. (1992). Serodiagnosis of leptospirosis in pigs using an axial filament enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Microbiol.*, **31**, 55–70.
59. MERIEN F., AMOURIAUX P., PEROLAT P., BARANTON G. & SAINT GIRON I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2219–2224.
60. MERIEN F., PARTNOI D., BOURHY P., CHARAVAY F., BERLIOZ-ARTHAUD A. & BARANTON G. (2005). A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol. Lett.*, **249**, 139–147.
61. MOREY R.E., GALLOWAY R.L., BRAGG S.L., STEIGERWALT A.G., MAYER L.W. & LEVETT P.N. (2006). Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 3510–3516.
62. NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES (1987). Microtitre technique for detection of *Leptospira* antibodies. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, **91**, 65–73.
63. NERVIG R.M. & GARRETT L.A. (1979). Use of furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation. *Am. J. Vet. Res.*, **40**, 1197–1200.
64. OIE S., KOSHIRO A., KONISHI H., & YOSHII Z. (1986) *In vitro* evaluation of combined use of fosfomycin and 5-fluorouracil for selective isolation of *Leptospira* species. *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 1084–1087.
65. OKUDA M., SAKAI Y., MATSUUCHI M., OIKAWA T., WATANABE M., ITAMOTO K., IWATA H., KANO R., HASEGAWA A., ONISHI T. & INOKUMA H. (2005). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine *Leptospira* antibodies using recombinant OmpL1 protein. *J. Vet. Med. Sci.*, **67**, 249–254.
66. PALANIAPPAN R.U., CHANG Y.F., CHANG C.F., PAN M.J., YANG C.W., HARPENDING P., McDONOUGH S.P., DUBOVI E., DIVERS T., QU J. & ROE B. (2005). Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Mol. Cell. Probes*, **19**, 111–117.
67. PALANIAPPAN R.U., CHANG Y.F., HASSAN F., McDONOUGH S.P., POUGH M., BARR S.C., SIMPSON K.W., MOHAMMED H.O., SHIN S., McDONOUGH P., ZUERNER R.L., QU J. & ROE B. (2004). Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *J. Med. Microbiol.*, **53**, 975–984.

68. PEROLAT P., LECUYER I., POSTIC D., & BARANTON G. (1993). Diversity of ribosomal DNA fingerprints of *Leptospira* serovars provides a database for subtyping and species assignment. *Res. Microbiol.*, **144**, 5–15.
69. PEROLAT P., MERIEN F., ELLIS W.A., & BARANTON G. (1994). Characterization of *Leptospira* isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1949–1957.
70. RALPH D., MCCLELLAND M., WELSH J., BARANTON G., & PEROLAT P. (1995). *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes. *J. Bacteriol.* **175**, 973–981.
71. RAMADASS P., JARVIS B.D.W., CORNER R.J., PENNY D., & MARSHALL R.B. (1992). Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* spp. by DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**, 215–219.
72. RAMADASS P., MEERARANI S., VENKATESHA M.D., SENTHILKUMAR A. & NACHIMUTHU K. (1997). Characterization of leptospiral serovars by randomly primed amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 575–576.
73. REITSTETTER R.E. (2006). Development of species-specific PCR primer sets for the detection of *Leptospira*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **264**, 31–39.
74. RIBOTTA M.J., HIGGINS R., GOTTSCHALK M. & LALLIER R. (2000). Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in dogs. *Can. J. Vet. Res.*, **64**, 32–37.
75. ROY S., BISWAS D., VIJAYACHARI P., SUGUNAN A.P. & SEHGAL S.C. (2004). A 22-mer primer enhances discriminatory power of AP-PCR fingerprinting technique in characterization of leptospires. *Trop. Med. Int. Health*, **9**, 1203–1209.
76. RUBY K.W., CARDELLA M.A. & KNUDTSON W.U. (1992). Assay for measuring relative potency of leptospiral bacterins containing serovar pomona. *Biologicals*, **20**, 259–266.
77. SALAUN L., MERIEN F., GURIANOVA S., BARANTON G. & PICARDEAU M. (2006). Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 3954–3962.
78. SAVIO M.L., ROSSI C., FUSI P., TAGLIABUE S. & PACCARINI M.L. (1994). Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 935–941.
79. SCANZIANI E. (1991). Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. *Res. Vet. Sci.*, **50**, 229–232.
80. SHENBERG E. (1967). Growth of pathogenic *Leptospira* in chemically defined media. *J. Bacteriol.*, **93**, 1598–1606.
81. SKILBECK N.W. & CHAPPEL R.J. (1987). Immunogold silver staining for visualization of leptospires in histologic section. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 85–86.
82. SLACK A.T., SYMONDS M.L., DOHNT M.F. & SMYTHE L.D. (2006). Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol.*, **27**, 95.
83. SLACK A., SYMONDS M., DOHNT M.F. & SMYTHE L.D. (2006). An improved multiple-locus variable number of tandem repeats analysis for *Leptospira interrogans* serovar Australis: a comparison with fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis and its use to redefine the molecular epidemiology of this serovar in Queensland, Australia. *J. Med. Microbiol.*, **55**, 1549–1557.
84. SMYTHE L.D., SMITH I.L., SMITH G.A., DOHNT M.F., SYMONDS M.L., BARNETT L.J. & MCKAY D.B. (2002). A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect. Dis.*, **8**, 13–22.
85. SURUJBALLI O. & ELMGREN C. (2000). Monoclonal antibodies suitable for incorporation into a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of specific antibodies to *Leptospira interrogans* serovar pomona. *Vet. Microbiol.*, **71**, 149–159.

86. SURUJBALLI O., HENNING D., MARENGER R. & HOWLETT C. (1997). Development of a monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjobovis antibodies in bovine sera. *Can. J. Vet. Res.*, **61**, 267–274.
87. SURUJBALLI O. & MALLORY M. (2001). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Leptospira interrogans* serovar pomona antibodies in bovine sera. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 40–43.
88. TAYLOR M.J., ELLIS W.A., MONTGOMERY J.J., YAN K.T., McDOWELL S.W., & MACKIE D. (1997). Magnetic immunocapture PCR (MIPA): detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Vet. Microbiol.*, **56**, 135–145.
89. TERPSTRA W.J., KORVER H., SCHOONE G.J., VAN LEEUWEN J., SCHÖNEMANN C.E., DE JONGE-AGLIBUT S. & KOLK A.H.J. (1987). Comparative classification of *Leptospira* serovars of the Pomona group by monoclonal antibodies and restriction-endonuclease analysis. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A]*, **266**, 412–421.
90. TERPSTRA W.J., KORVER H., VAN LEEUWEN J., KLATSER P.L. & KOLK A.H.J. (1985). The classification of sejroe group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A]*, **259**, 498–506.
91. THIERMANN A.B., HANDSAKER A.L., FOLEY J.W., WHITE F.H. & KINGSCOTE B.F. (1986). Reclassification of North American leptospiral isolates belonging to serogroups Mini and Sejroe by restriction endonuclease analysis. *Am. J. Vet. Res.*, **47**, 61–66.
92. THIERMANN A.B., HANDSAKER A.L., MOSELEY S.L. & KINGSCOTE B. (1985). New method for classification of leptospiral isolates belonging to serogroup pomona by restriction endonuclease analysis: serovar *kennewicki*. *J. Clin. Microbiol.*, **21**, 585–587.
93. TRUCCOLO J., CHARAVAY F., MERIEN F. & PEROLAT P. (2002). Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 848–853.
94. TRUEBA G.A., BOLIN C.A. & THOEN C.O. (1990). Evaluation of an enzyme immunoassay for diagnosis of bovine leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type hardjo-bovis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2**, 323–329.
95. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE STANDARD REQUIREMENTS § 113.26.
96. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE STANDARD REQUIREMENTS § 113.38.
97. VAN EYS G.J., GRAVEKAMP C., GERRITSEN M.J., QUINT W., CORNELISSEN M.T., SCHEGGET J. T. & TERPSTRA W.J. (1989). Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 2258–2262.
98. VIJAYACHARI P., HARTSKEERL R.A., SHARMA S., NATARAJASEENIVASAN K., ROY S., TERPSTRA W.J. & SEHGAL S.C. (2004). A unique strain of *Leptospira* isolated from a patient with pulmonary haemorrhages in Andaman Islands: a proposal of serovar Portblairi of serogroup Sehgal. *Epidemiol. Infect.*, **132**, 663–673.
99. WILD C.J., GREENLEE J.J., BOLIN C.A., BARNETT J.K., HAAKE D.A. & CHEVILLE N.F. (2002). An improved immunohistochemical diagnostic technique for canine leptospirosis using antileptospiral antibodies on renal tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **14**, 20–24.
100. WOO T.H., PATEL B.K., SMYTHE L.D., SYMONDS M.L., NORRIS M.A. & DOHNT M.F. (1997). Comparison of two PCR methods for rapid identification of *Leptospira* genospecies *interrogans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**, 169–177.
101. WOO T.H., PATEL B.K., SMYTHE L.D., SYMONDS M.L., NORRIS M.A. & DOHNT M.F. (1997). Identification of pathogenic *Leptospira* genospecies by continuous monitoring of fluorogenic hybridization probes during rapid-cycle PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 3140–3146.
102. WOO T.H., SMYTHE L.D., SYMONDS M.L., NORRIS M.A., DOHNT M.F. & PATEL B.K. (1997). Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **150**, 9–18.
103. WOODWARD M.J., SULLIVAN A.G., PALMER N.M.A., WOOLEY J.C. & REDSTONE J.S. (1991). Development of a PCR test specific for *Leptospira hardjo* genotype bovis. *Vet. Rec.*, **128**, 282–283.

104. YAN K.T., ELLIS W.A., MACKIE D.P., TAYLOR M.J., McDOWELL S.W. & MONTGOMERY J.M. (1999). Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in cattle. *Vet. Microbiol.*, **69**, 173–187.
105. YASUDA P.H., STEIGERWALT A.G., SULZER K.R., KAUFMANN A.F., ROGERS F. & BRENNER D.J. (1987). Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**, 407–415.
106. ZAKI S.R. & SHIEH W.-J. (1996). Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. *Lancet*, **347**, 535–536.
107. ZUERNER R.L., ALT D. & BOLIN C.A. (1995). IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 3284–3289.
108. ZUERNER R.L. & BOLIN C. A. (1997). Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS1500 hybridization and PCR assays. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2612–2617.

*

* *

NB: Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la Leptospirose (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

MYIASE À *Cochliomyia hominivorax* ET MYIASE À *Chrysomya bezziana*

RÉSUMÉ

La myiase à *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) ou du Nouveau Monde (CH-NM), et la myiase à *Chrysomya bezziana* Villeneuve ou de l'Ancien Monde (CB-AM)¹ sont, des maladies dues à l'infestation de larves de mouches qui, à l'état larvaire, sont des parasites obligés des mammifères. Ces deux espèces appartiennent à la sous-famille des Chrysomyinae, de la famille des Calliphoridae, dans l'ordre des Diptera (mouches vraies). Les larves, qui se nourrissent de la peau et des tissus sous-jacents, sont des agents de plaies et de myiases traumatiques pouvant être mortelles. L'infestation se réalise généralement au niveau de plaies préexistantes, dues à des causes banales ou à des pratiques d'élevage, mais elle peut aussi intervenir au niveau des muqueuses et des orifices naturels du corps.

Les mouches femelles sont attirées par les plaies, sur le bord desquelles chacune pond en moyenne 175 (CB-AM) ou 340 (CH-NM) œufs. Les larves éclosent après 12 à 24 h d'incubation et se nourrissent immédiatement, en enfonçant leur tête dans la plaie. Après trois stades larvaires, elles quittent leur hôte et tombent sur le sol, dans lequel elles s'enfouissent et forment des pupes. La durée de l'évolution sur le sol dépend de la température ambiante, la chaleur la réduisant, et le cycle complet dure moins de 3 semaines en milieu tropical.

Le traitement consiste en l'application d'insecticides organophosphorés dans les plaies, pour détruire les larves et assurer une protection résiduelle contre les ré-infestations. Pour la prévention, on a recours à des baignades avec des préparations insecticides ou à des pulvérisations de ces préparations. Plus récemment, on utilise, chez les animaux exposés au risque, l'ivermectine (en particulier la doramectine), en injection sous-cutanée. Une autre mesure préventive est la surveillance étroite des déplacements des animaux en dehors des régions infestées.

Identification de l'agent pathogène : il est facile de confondre les larves de CH-NM et de CB-AM avec celles d'autres agents de myiases. Une diagnose précise exige l'isolement des larves des parties profondes des plaies. L'examen des larves mûres du troisième âge (L3) fournit les résultats les plus sûrs. Les L3 de CH-NM sont reconnaissables à la coloration brune du tronc trachéen dorsal, qui s'étend, en avant, du douzième jusqu'au dixième voire au neuvième segment ; ce caractère est propre aux larves de CH-NM. En ce qui concerne les larves de CB-AM, le diagnostic se base sur les caractères de leur spinulation, le nombre des lobes, ses stigmates antérieurs (de 4 à 6) et la pigmentation du tronc trachéal secondaire.

Sous leur forme adulte, les espèces du genre *Cochliomyia* sont distinguées de celles des autres genres impliqués dans l'étiologie des myiases des plaies : une couleur métallique bleue/verte avec 3 bandes longitudinales brunes sur le thorax. La distinction entre CH-NM et une espèce très voisine, *C. macellaria* et l'identification de CB-AM adultes est exposée dans ce chapitre.

Épreuves sérologiques : on ne dispose pas, actuellement, de méthodes sérologiques qui, d'ailleurs, ne sont pas nécessaires au diagnostic des myiases des plaies. Cependant, la sérologie pourra dans le futur avoir un rôle pour étudier la prévalence de ces myiases.

1 Dans ce chapitre, l'expression « Nouveau Monde » se rapporte à l'Amérique et l'expression « Ancien Monde » concerne l'Europe, l'Afrique et l'Asie.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique :
aucun vaccin ni produits d'origine biologique ne sont actuellement disponibles, excepté pour l'utilisation de mouches mâles stérilisées dans le cadre de la méthode des insectes stériles (MIS). Pour cette méthode, un grand nombre de mâles stérilisés en laboratoire sont lâchés dans l'environnement, où ils s'accouplent avec des femelles sauvages, qui pondront des œufs non fécondés. Ainsi, la population est progressivement réduite, jusqu'à son éradication.

A. INTRODUCTION

Les agents de la myiase à *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) ou du Nouveau Monde (CH-NM) et celle à *Chrysomya bezziana* Villeneuve ou de l'Ancien Monde (CB-AM), sont des espèces qui appartiennent à deux genres de la sous-famille des *Chrysomyinae*, dans la famille des *Calliphoridae* : « Mouches à viande ». Ces deux espèces sont parasites obligés des mammifères, les humains compris, et rarement des oiseaux. Bien que situés dans des genres différents et géographiquement séparés, ces parasites ont eu une évolution remarquablement parallèle. Leur biologie est presque identique, car ils occupent, dans leur aire de répartition respective, des niches écologiques identiques. Sauf exception, les considérations suivantes concernent les deux espèces.

Contrairement aux autres espèces de Mouches à Viande, les femelles adultes de CH-NM et CB-AM ne pondent pas sur des cadavres, mais sur des individus vivants, à la périphérie de plaies ou au pourtour des orifices naturels. Elles sont théoriquement attirées par toute sorte de plaies, résultant soit de processus naturels (agressions réciproques, action de prédateurs, blessures par agents traumatisants, maladies, piqûres d'insectes ou de tiques), soit infligées par l'homme (tonte, marquage, castration, moyens d'immobilisation, perforation des oreilles pour insertion de boucles d'identification). L'ombilic des animaux nouveau-nés, la vulve et la région périnéale des femelles sont des points d'élection de la ponte. Si les œufs sont pondus sur des muqueuses, les larves peuvent pénétrer des corps sains par exemple au niveau des narines et des sinus, de la bouche, des orbites et des orifices génitaux.

Après une incubation de 12 à 24 h des œufs déposés, les larves éclosent et se nourrissent immédiatement des sécrétions des plaies et des tissus sous-jacents, se « vissant » dans ces tissus, qu'elles déchirent par leurs pièces buccales en hameçon, élargissant et creusant ainsi la plaie. Cette plaie dégage une odeur caractéristique, première indication qu'au moins un animal du troupeau est infesté. Si cette odeur n'est pas toujours perçue par l'homme, elle l'est par les mouches femelles pleines (19), qu'elle attire et qui vont pondre de nouvelles « portées » d'œufs aggravant ainsi le processus infestant. Sans traitement, cette infestation peut être mortelle.

Les larves vont passer par 3 stades larvaires séparés par des mues qui leur permettent une croissance rapide et elles atteignent leur maturité au bout de 5 à 7 jours après l'éclosion. Elles cessent alors de s'alimenter, se détachent de la plaie et tombent sur le sol, dans lequel elles se terrent et se transforment en pupes, qui ont une forme de tonnelet brun à enveloppe ferme, résultant du durcissement et de la pigmentation de la cuticule larvaire. Les insectes adultes émergent de la pupe dans la matinée et, après que leurs ailes se soient étendues et renforcées, prennent leur vol. Les mâles sont aptes à la reproduction dans les 24 h suivant leur éclosion mais les ovaires des femelles n'atteignent leur maturité qu'après 6 à 7 jours, et les femelles ne peuvent s'accoupler qu'à l'âge de 3 jours ; 4 jours après l'accouplement, elles sont aptes à la ponte. Elles recherchent alors un hôte pour déposer leurs œufs. Ceux-ci sont tous orientés dans le même sens (aspect en tuiles de toit) et solidement fixés les uns aux autres et sur le substrat. Une ponte comprend un nombre d'œufs variable qui dépend de divers facteurs (notamment la fatigue du vol avant la découverte d'un hôte et la réaction de l'hôte à l'agression) ; mais il est de l'ordre de 175 pour CB-AM et de 340 pour CH-NM (43). Les pontes se succèdent à intervalles de 3 à 4 jours (51). La longévité des mouches adultes est de 2 à 3 semaines, pendant lesquelles elles se nourrissent sur des fleurs, tandis que les femelles absorbent aussi les protéines des sérosités des plaies.

La rapidité de l'évolution larvaire dépend de la température de l'environnement et de celle des plaies, avec ralentissement aux températures basses, mais sans diapause. Ce sont surtout les pupes qui sont affectées par le facteur thermique et le stade pupaire peut durer de 1 semaine à 2 mois selon la saison (24). Ainsi, le cycle évolutif complet de CH-NM s'étend sur 2 à 3 mois par temps frais (36), tandis qu'en milieu tempéré, à la température moyenne de 22 °C, il s'accomplit en 24 jours (22) et en milieu, tropical, à 29 °C, il se termine en 18 jours (51).

Le degré de tolérance au froid de CH-NM et CB-AM a une grande incidence sur leur répartition, cela est le mieux documenté pour CH-NM. Historiquement, CH-NM est connu pour s'être étendu depuis le sud des États-Unis d'Amérique (USA) jusqu'en Uruguay et le nord du Chili et de la République Argentine, en passant par le Mexique, l'Amérique Centrale et les îles des Caraïbes (22). Sa répartition, réduite en hiver, s'agrandit en été, conférant à l'infestation un caractère saisonnier à la périphérie de son aire de répartition géographique et annuelle dans son aire centrale : la région tropicale du Nouveau Monde. L'utilisation de la méthode des insectes stériles (MIS) a permis l'éradication de la myiase à CH-NM aux USA (6), au Mexique (17), à Curaçao, à Porto Rico, dans les îles Vierges, en Amérique Centrale (Guatemala, Belize, Salvador, Honduras, Nicaragua) et, en l'an 2000, au Costa

Rica (55). En Amérique Centrale, le processus d'éradication se poursuit au Panama, où il a commencé en juillet 1998. L'objectif ultime est l'établissement d'une barrière au Panama, qui sera ainsi la limite Nord de la répartition de CH-NM dans les Amériques. Un programme d'éradication a été lancé à la Jamaïque en juillet 1998, dans le cadre de la suppression totale de l'infestation dans les Caraïbes. Ce programme a connu des contretemps dus à des problèmes de gestion et des difficultés techniques, mais il se poursuit sans que son avenir soit assuré (12, 53). Bien que *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) soit une espèce du Nouveau Monde, on l'a observé en Libye et au Maghreb, où, heureusement, elle a été éradiquée, en 1991, grâce à une intense campagne de MIS (14, 26). Mais la menace d'une extension des myiases à CH-NM et CB-AM par les systèmes de transport rapides est toujours présente ; elle impose une vigilance constante comme des quarantaines et d'autres mesures de défense de la santé animale et la présence d'inspecteurs sanitaires dans les pays encore non infestés. Des cas importés de myiase à CH-NM ont été signalés récemment au Mexique, aux USA et même en Grande-Bretagne (30).

Comme l'indique sa dénomination, la myiase à CB-AM est distribuée dans la plupart des pays africains (depuis l'Éthiopie et l'Afrique sub-saharienne jusqu'au nord de l'Afrique du Sud), dans les pays du Golfe, le sous-continent indien, et l'Asie du Sud-est (depuis la partie méridionale de la Chine, jusqu'en Indonésie, aux Philippines et en Nouvelle Guinée, en passant par la péninsule de Malaisie) (22, 43, 47, 56). La myiase à CB-AM a aussi été signalée pour la première fois à Hong-Kong en 2000, sur des chiens, et un premier cas humain a été décrit en 2003 (35). Elle a également été signalée en Algérie chez un berger (1) ; mais en l'absence d'autres observations, particulièrement chez les animaux, on ne peut pas considérer sa présence comme endémique et le premier cas pourrait être le résultat d'une fausse identification. En revanche, la situation est différente dans les pays du Golfe et limitrophes où de récentes observations de cas en Iran (34) et en Irak (2) confirment la présence de la maladie. Dans ces régions où les éleveurs et les vétérinaires ne sont pas familiarisés avec la myiase à CB-AM, des épizooties à myiases traumatiques peuvent survenir suite à des introductions (38). Les conditions climatiques favorables aux deux espèces – CH-NM et CB-AM – sont semblables, de sorte qu'en l'absence de mesures les limitant, les aires de répartition de ces parasites peuvent se superposer (47).

Les insecticides organophosphorés, dichlofenthion, fenchlorphos, et surtout coumaphos, sont recommandés pour le traitement des plaies infestées par CH-NM et CB-AM (16, 37, 45). Ils ont pour effet d'expulser les larves, lesquelles tombées sur le sol ne se développent pas et meurent. Ces larves mortes doivent être ramassées. Afin d'assurer une protection résiduelle contre toute ré-infestation, il faut traiter tous les 2 à 3 jours, jusqu'à guérison de la plaie. Des sachets de 5 g de poudre mouillable à 5 % de coumaphos sont répandus sur la plaie ou, mêlés à 33 ml d'huile, appliqués en massage. Les composés organophosphorés peuvent aussi être appliqués sous la forme d'aérosols, contenant des marqueurs colorés et des produits bactériostatiques ou sous une forme pulvérulente. Le dichlofenthion est utilisé en Amérique du Sud, en aérosols à 1 % pour traiter la myiase à CH-NM, mais est aussi efficace contre la myiase à CB-AM (37). Toutes les larves qui meurent doivent être enlevées pour éviter les infections. Il faut toujours veiller à bien se conformer aux prescriptions des fabricants.

La prophylaxie des infestations est possible par pulvérisation ou baignade, utilisant une suspension aqueuse à 0,25 % de coumaphos, préparée à partir d'une poudre mouillable à 50 % ou de tout autre insecticide organophosphoré, à la concentration maximale préconisée pour le traitement des ectoparasitoses. Ces interventions ont un double effet : premièrement le traitement tue directement les larves et procure une protection résiduelle ; et deuxièmement il tue les tiques et autres parasites externes qui pourraient être générateurs de plaies, sites de ponte des «mouches». Les pyréthroïdes de synthèse sont potentiellement actifs, mais peu d'essais de traitement ont été effectués (cf. perméthrine sur CH-NM : réf. 39). Des pulvérisations ou des bains doivent être imposés à tous les troupeaux parasités ou vivant en régions contaminées ou appelés à traverser ces régions, ainsi qu'aux animaux ayant subi des interventions, telle la tonte.

Une injection sous-cutanée unique d'ivermectine (200 µg/kg) était efficace pour la prévention de l'infestation de la plaie ombilicale de veaux nouveau-nés (37) et des plaies de castration (44) par CB-AM. L'ivermectine prévenait également l'infestation des plaies chez les sujets adultes. Les bovins recevant des bols à libération prolongée d'ivermectine étaient protégés contre la myiase à CB-AM pendant des périodes de 14 à 102 jours après le traitement (54). Mais l'ivermectine est préjudiciable aux espèces de la faune coprophage d'où la recommandation de n'utiliser les bolus médicamenteux que pour la prophylaxie des poussées d'infestation par CB-AM. On a d'abord cru à l'inefficacité de l'ivermectine contre CH-NM, (Mackley et Brown, réf. 17), mais des observations plus récentes ont mis en évidence son activité contre les infestations ombilicales et scrotales par ce parasite (7, 28). La doramectine a une efficacité nettement plus régulière que l'ivermectine (18). Un nombre de plus en plus élevé de publications font état de 100 % d'efficacité de la doramectine, en injection sous-cutanée (200 µg/kg), pour la prophylaxie de l'infestation des plaies de castration et des plaies de l'ombilic des veaux et des plaies consécutives à l'accouchement chez les vaches, pendant des périodes de l'ordre de 12-14 jours après l'administration (4, 32, 33). Le traitement à la doramectine ne réduit pas la ponte des œufs et est donc efficace car il ne repousse pas les mouches qui autrement iraient pondre sur des animaux non traités. L'activité de la doramectine et de l'ivermectine dépend de la race des animaux traités et de l'importance de l'infestation. Un essai comparatif a montré que les deux produits, administrés à la dose de 200 µg/kg, en injection sous-cutanée, confèrent une protection de 100 % pour la doramectine et 50 % pour l'ivermectine, contre l'infestation par CH-NM, commençant 2 h après l'injection (31). La doramectine assure aussi une protection totale pendant 21 jours et une protection de 56 % pendant 28 jours après le traitement (31). Une autre expérimentation, à plus grande échelle, a mis en évidence une efficacité moyenne de 94,6 % (comprise entre 53,3 et 100 %) de la

doramectine contre 43,7 %, (comprise entre 0 et 100 %) pour l'ivermectine (10). L'abamectine, en injection sous-cutanée (200 µg/kg) protège les plaies de castration contre l'infestation par CH-NM, mais n'est pas efficace à 100 % (3). L'épandage dorsal («pour on») de préparations à base de moxidectine, éprinomectine et doramectine, comparé à l'injection de doramectine n'est que faiblement actif à l'encontre de CB-AM (54). Quelques observations préliminaires révèlent l'action, favorable du fipronil (un dérivé du phénylpyrazol) pour la prévention des myiases consécutives à l'infestation des plaies de castration des bovins. L'application d'une solution à 1 % de fipronil à la dose de 10 mg/kg de poids vif n'a pas empêché l'oviposition par la CH-NM mais a réduit le pourcentage de bœufs ayant développé une myiase clinique au cours des 10 jours critiques suivant la période de castration, alors que la plupart des pontes avaient eu lieu, de 65 % chez les témoins non traités à juste 3 % chez les animaux traités (25). Pareillement, l'application d'un régulateur de croissance des insectes, le dicyclanil, prévient la myiase à CH-NM dans plus de 90 % des cas (5). Les régulateurs de croissance, étant très spécifiques des insectes, ils présentent moins de risques pour l'environnement que les insecticides. Le Spinosad, une formulation à base de produits dérivés de la fermentation d'une bactérie et ayant une faible toxicité pour les mammifères et les oiseaux s'est révélé efficace dans le traitement et la prévention de la myiase due à CH-NM ou à CB-AM quand il est appliqué comme aérosol (41).

La prophylaxie indirecte des myiases dues aux « mouches à viande » comporte l'évitement de la formation de plaies aux périodes de pullulation de ces insectes, notamment par le retrait de tous objets vulnérants (fils de fer barbelés, etc.) et la mise en œuvre de mesures, destinées à diminuer le nombre des autres parasites générateurs de plaies, comme les tiques en effectuant par exemple des baignades ou en posant des dispositifs auriculaires imprégnés d'insecticides.

La prévention de la dispersion de ces « Myiases », au-delà des limites précédemment mentionnées, exige la stricte observation des règles du commerce international établies par l'OIE (*Code sanitaire pour les animaux terrestres*).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

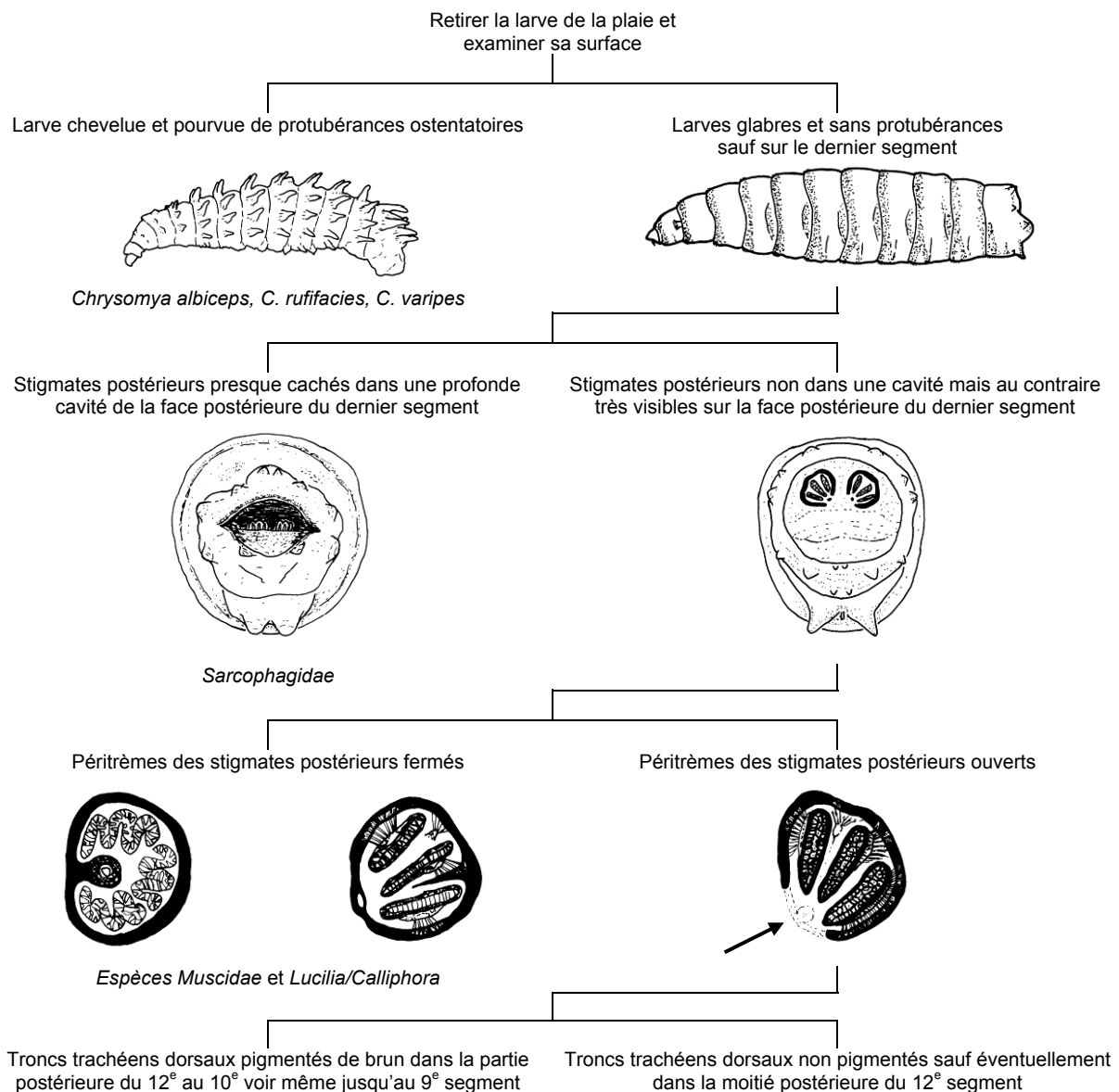
La diagnose morphologique des œufs et des larves du premier âge des insectes agents des myiases est difficile car ces formes évolutives ont une durée de vie courte et sont donc rarement isolées des plaies infestées. Nous n'envisagerons pas cet aspect.

Les larves recueillies aux fins de diagnose doivent être isolées des parties profondes des plaies, afin d'éviter le prélèvement d'espèces superficielles, n'appartenant pas aux agents des myiases à CH-NM et CB-AM. Il faut d'abord examiner la pigmentation des troncs trachéens des larves vivantes (fig. 1 et 4), puis fixer ces parasites par immersion dans de l'alcool éthylique à 80° pour examen consécutif au microscope à dissection à des grossissements pouvant atteindre × 50 (en ce qui concerne d'autres techniques, cf. réf. 13, 21, 42, 56). Lorsque les larves sont plongées directement dans la plupart des solutions de conservation, elles se rétractent et s'assombrissent. La meilleure façon de fixer les larves en position étendue, est de les tuer par immersion dans de l'eau bouillante (pendant 15 à 30 s), avant de les immerger dans de l'alcool à 80 %. Cette technique n'a aucun effet néfaste sur les étapes suivantes comme l'extraction de l'ADN mitochondrial et l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) (20), mais elle peut en avoir pour d'autres techniques moléculaires ; ce point doit être gardé en mémoire.

Larves du deuxième âge : les larves du deuxième âge (L2) ne possèdent que deux fentes stigmatiques sur les plaques stigmatiques postérieures, par opposition aux 3 fentes des larves du troisième âge (fig. 2 et 3). Les L2 de CH-NM sont identifiées par la pigmentation brune des troncs trachéens dorsaux sur plus de la moitié de leur longueur du segment terminal. Cette pigmentation est moins étendue chez les autres espèces, par exemple, ces troncs ne sont pas pigmentés, chez CB-AM, sur plus de 1/3 de la longueur du douzième segment. Les stigmates antérieurs des L2 de CH-NM ont de 7 à 9 branches contre 4 pour CB-AM (23). Des critères d'identification plus précis peuvent être obtenus si on laisse le développement se poursuivre jusqu'au troisième âge (L3). Pour ce faire, on peut utiliser du milieu à la viande normalisé pour une croissance accélérée de CH-NM, avant que ce milieu ne soit remplacé par un gel d'alimentation comprenant 1 litre d'eau, 1,3 kg de viande de cheval ou de bovin, 50 g de sang desséché de bœuf et 1,5 ml de formol commercial (49), mélangé et maintenu à 35 - 38 °C et 70 % d'humidité relative. Si la croissance n'a pour but que l'identification des larves, la nature de la viande et du sang n'est pas essentielle et du sang frais, lequel est plus facilement disponible, pourra être utilisé au lieu du sang desséché.

Larves du troisième âge : Les larves du troisième âge (L3) de CH-NM comme celles de CB-AM ont la forme typique d'asticots, avec un corps cylindrique mesurant de 6 à 17 mm de longueur et 1 à 3,6 mm de diamètre et une extrémité antérieure effilée (24, 42). À maturité, elles ont une coloration rouge rosée superposée à la coloration crèmeuse des formes plus jeunes. Dans les deux espèces, les L3 portent des rangs d'épines saillantes

disposées en cercles sur les segments larges. Ces épines apparaissent, au microscope, larges et visibles lorsqu'on les compare à celles de la plupart des autres agents de myiases, les plus longues atteignent 130 µm. Les épines des L3 de CH-NM ont une pointe simple ou bicuspidée, tandis que celles de CB-AM n'ont toujours qu'une pointe simple (fig. 2). Les stigmates antérieurs de CH-NM possèdent chacun de 6 à 11 branches bien séparées, mais on en observe le plus généralement de 7 à 9 (fig. 2). Ceux de CB-AM ont chacun de 3 à 7 branches, mais de même on en observe le plus généralement de 4 à 6 (fig. 2). Ce dernier caractère ne doit pas être utilisé seul pour la diagnose de CB-AM, parce que les L3 d'un autre agent des myiases de l'Ancien Monde, *Wohlfartia magnifica* (Diptères, *Sarcophagidae*), qui est répandu au Moyen-Orient, possède des stigmates antérieurs ayant la même ramification. C'est pourquoi, lorsqu'on utilise une clé de diagnose comme celle de la figure 1, il est nécessaire de considérer tous les caractères morphologiques disponibles. Les stigmates postérieurs, portés par le dernier segment des larves, sont pigmentés de brun et ont des périrèmes incomplets, entourant en partie 3 fentes stigmatiques ovales, convergeant vers l'ouverture du périrème ; ces caractères pour le diagnostic sont illustrés à la figure 3. Un caractère de diagnose très important des L3 de CH-NM est la pigmentation brune des troncs trachéens dorsaux, étendus depuis les stigmates postérieurs jusqu'au dixième ou neuvième segment (fig. 1 et cf. réf. 13, 15, 18, 21, 22, 42, 56 pour les clés de diagnose). Ce caractère, bien visible sur les larves vivantes, ne peut être observé, sur les larves fixées, qu'après ablation des tissus qui couvrent les troncs. Chez les larves de CB-AM, les troncs trachéens dorsaux ne sont pigmentés que sur le douzième segment. Cependant, dans cette espèce, les ramifications des troncs dorsaux sont pigmentés depuis le douzième segment jusqu'au moins le dixième (caractère confirmé sur des exemplaires en provenance de Malaisie, de Bahrein et du Zimbabwe : M.J.R. Hall, non publié). Au contraire, chez CH-NM, seules les trachées dorsales sont pigmentées, tandis que les ramifications secondaires ne le sont pas. Ainsi, la pigmentation trachéenne des deux espèces est pratiquement inversée (fig. 4).



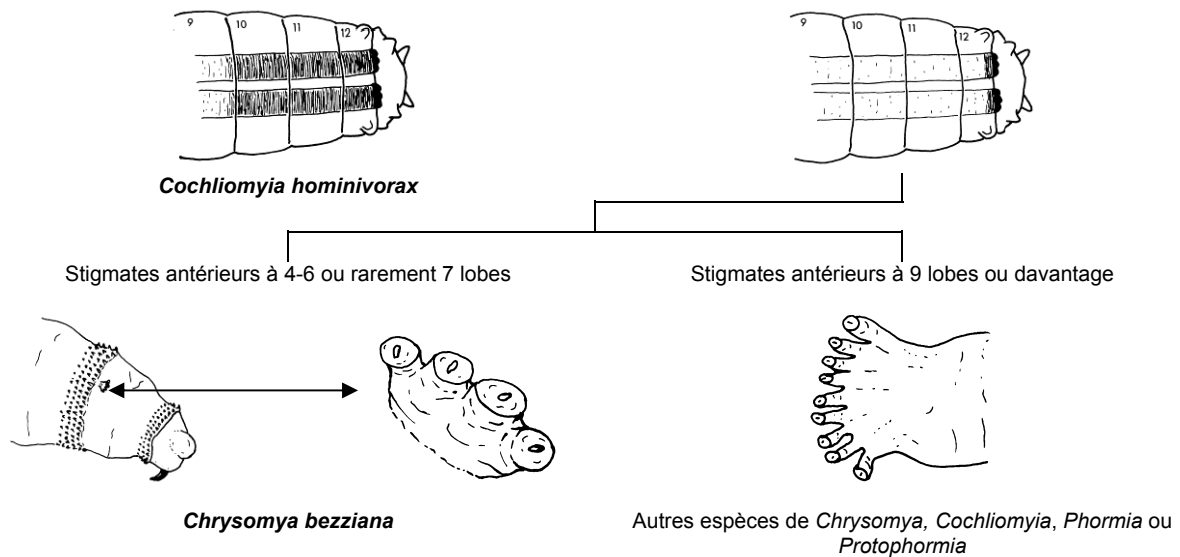


Fig. 1 Clé d'identification pour la diagnose des larves 3 de *Cochliomyia hominivorax* et *Chrysomya bezziana*, à partir de cas de myiases des plaies. Afin d'éviter des erreurs d'interprétation, il est essentiel que la clé soit utilisée à partir de la première étape pour chaque échantillon.



Fig. 2. La tête et les deux premiers segments thoraciques de la larve du troisième âge de *Cochliomyia hominivorax* (à gauche, vue au microscope à balayage ; l'encadré renferme le stigmate antérieur de *Chrysomya bezziana*) et de *Chrysomya bezziana* (à droite, vu au microscope optique, noter les épines en forme de crochets ; la préparation a été éclaircie dans de la potasse à 10 % de façon à rendre visibles les stigmates antérieurs de chaque côté du premier segment thoracique). as = stigmates antérieurs

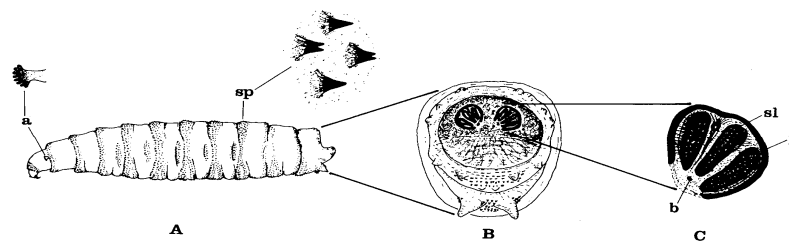


Fig. 3. Caractères des larves du troisième âge de *Cochliomyia hominivorax* : (A) larve entière, vue latérale ; (B) face postérieure du dernier segment ; (C) plaque stigmatique postérieure ; a = stigmate antérieur ; b = bouton adjacent à l'ouverture du périrème ; p = périrème ; sl = fente stigmatique ; sp= épines. (d'après Laake et al. [24]).

Insectes adultes : les mouches adultes sont capturées dans des pièges tournés vers le vent (8) ou des pièges à colle (42), appâtés par une odeur de synthèse, *swormlure-4* (29). Un autre piège et un nouvel attractif (« Bezzilure ») sont en cours de mise au point pour la surveillance de la myiase à CH-AM en Australie (Rudolf Urech, communication personnelle). D'autres systèmes de capture des échantillons sont utilisés dans le cadre de projet de recherche : par exemple des grilles électriques ou des surfaces adhésives à appâts visuels et odoriférants (19). L'identification des insectes adultes est rarement nécessaire pour le diagnostic d'une Myiase, car ce sont les larves que les éleveurs et les vétérinaires ont le plus de chances d'observer. Cependant, nous en donnons une brève description ci-dessous :

- i) **CH-NM** : longueur de 8 à 10 mm ; coloration métallique allant du bleu foncé au bleu-vert ; 3 bandes longitudinales sur la face dorsale du thorax. Cette association de caractères n'est observée chez aucune autre espèce de myiases des plaies, à l'exception d'un autre agent de myiases du Nouveau Monde, *Cochliomyia macellaria* (Fabricius). Ces deux espèces de *Cochliomyia* peuvent être distinguées par la présence de petites soies noires sur la plaque fronto-orbitale de CH-NM, par opposition aux poils jaunes clairs de *C. macellaria*. Le cinquième (quatrième visible) tergite abdominal de CH-NM n'est couvert que d'une fine poussière latérale, tandis que chez *C. macellaria*, il porte une paire de tâches argentées. De plus, la base de la nervure costale est de couleur brune chez les femelles de CH-NM et jaune chez les femelles de *C. macellaria* (fig. 5 et réf. 11, 15, 24, 42).
- ii) **CB-AM** : longueur de 10 mm ; coloration très voisine de celle de CH-NM, mais absence des bandes thoraciques longitudinales. La squame inférieure («s» dans la fig. 5) se différencie de celle de CH-NM par la pilosité dont elle est recouverte (comme toutes les espèces de *Chrysomya*), alors que chez CH-NM, elle est glabre, sauf à sa base. Les CB-AM adultes se différencient des autres *Chrysomya* trouvés lors de myiases par l'association d'une coloration brune ou orangé foncé des stigmates thoraciques (plutôt que, jaune sale, blanche ou crème) et d'une couleur blanc-cire de la squame inférieure (plutôt que brune ou gris sale) (42, 56).

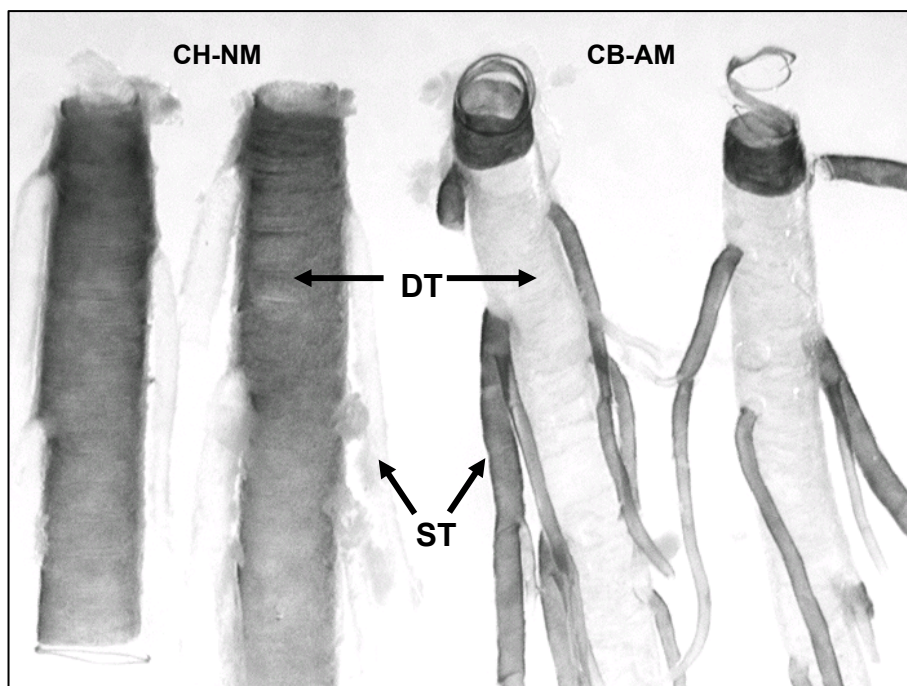


Fig. 4. Tronc trachéal dorsal de la larve de 3e âge de *Cochliomyia hominivorax* (à gauche) et de *Chrysomya bezziana* (à droite) disséqué du stigmate postérieur (en haut) au 9e segment abdominal (en bas). À noter que les pigmentations du tronc dorsal principal (DT) et des troncs secondaires plus petits (ST) sont pratiquement inversées entre les deux espèces.

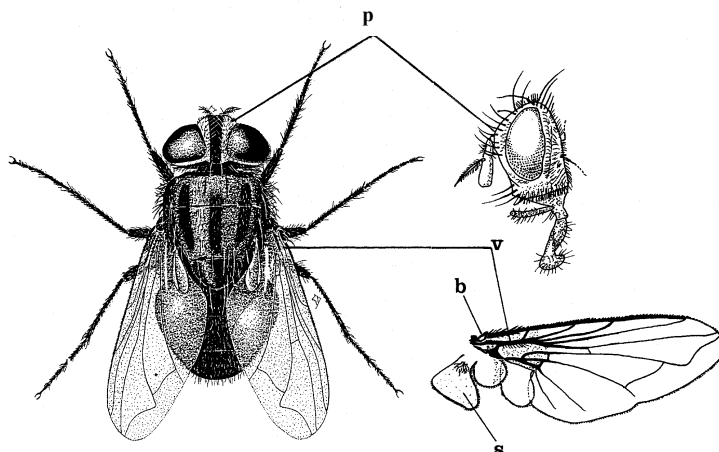


Fig. 5. Caractères des formes adultes de *Cochliomyia hominivorax* ; noter les bandes thoraciques longitudinales ; *b* = base de la nervure costale ; *p* = plaque fronto-orbitale, indiquée ci-dessus sur le schéma à gauche représentant la mouche *Cochliomyia hominivorax* et sur le schéma en haut à droite représentant une vue latérale de la tête d'une espèce typique de *Calliphoridae* ; *s* = squame inférieure, glabre, sauf à sa base ; *v* = nervure principale, porteuse de poils sur sa surface dorsale postérieure.

Outre les critères morphologiques de base ci-dessus exposés, des méthodes plus récentes d'identification des agents des myiases traumatiques ou cavitaires et de leur origine géographique existent et incluent l'analyse des glucides cuticulaires (9), de l'ADN mitochondrial (20, 27, 50), de la séquence complète de 16 022 pb qui est connue pour CH-NM et l'utilisation de la PCR-RADP (amplification aléatoire de l'ADN polymorphe) (40). Les difficultés d'identification des larves et des insectes adultes peuvent être soumises au Centre collaborateur de la FAO qui est en charge des insectes myiasigènes et de leur identification².

2. Examens sérologiques

Aucune méthode sérologique n'est disponible actuellement pour le diagnostic des myiases déterminées par CH-MN et CB-AM et aucune n'est indiquée pour le diagnostic de ces maladies. Cependant des études scientifiques ont montré que les examens sérologiques pourraient, dans le futur, avoir une valeur potentielle pour la mise en évidence des anticorps sont produits après infestation et cela dans le cadre de recherche sur la prévalence des infestations par CH-NM et CB-AM dans des populations données d'animaux (52).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Nous ne disposons pas, actuellement, de produits biologiques comme les vaccins, mais des recherches sont en cours en la matière (48). La seule méthode actuelle d'éradication biologique de la myiase à CH-NM est la méthode des insectes stériles (MIS) (17, 26), qui a aussi été appliquée expérimentalement à la myiase à CB-AM (46). Pour cette méthode, les insectes mâles sont stérilisés, à la dernière phase de la vie pupaire, par irradiation gamma ou rayons X et lâchés en grand nombre dans la nature. Les femelles sauvages accouplées avec ces mâles ne pondent que des œufs stériles, ce qui conduit progressivement à une réduction de la population, voire éventuellement à son éradication. La MIS est complétée sur le terrain par le traitement des plaies avec des insecticides, par un contrôle strict des mouvements des troupeaux, par la mise en quarantaine des animaux infestés et par une campagne active de sensibilisation auprès du public concerné. Cependant, la MIS, du fait des coûts de production de base et de la dispersion des mouches stériles, est très coûteuse. Historiquement, elle n'a été considérée comme financièrement valable, que lorsqu'elle fut utilisée en vue d'un plan d'éradication dans les situations où les conditions géographiques étaient favorables (14, 26). Pendant des années, il n'existait qu'une usine de production de mâles stériles de CH-NM, basée dans le sud de Mexico à Tuxtla Gutierrez. Fin 2006, une

² Département d'Entomologie, The Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7 5BD, Royaume-Uni. Fax : +44 207 942 5229. E-mail: m.hall@nhm.ac.uk

seconde unité de production a ouvert au Panama³. En Malaisie, une unité expérimentale pour produire des mâles stériles de CH-NM a été ouverte en 1998⁴.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABED-BENAMARA M., ACHIR I., RODHAIN F. & PEREZ-EID C. (1997). Premier cas algérien d'otomyiase humaine à *Chrysomya bezziana*. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales*, **90**, 172–175.
2. AL-IZZI M.A.J., AL-TAWHEEL A.A. & JASSIM F.A. (1999). Epidemiology and rearing of Old World screwworm, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera: Calliphoridae) in Iraq. *Iraqi J. Agricul.*, **4**, 153–160.
3. ANZIANI O.S., GUGLIELMONE A.A. & AGUIRRE D.H. (1995). Administracion de abamectina para la prevencion de miasis (*Cochliomyia hominivorax*) post castracion en bovinos. *Veterinaria Argent.*, **12**, 233–236.
4. ANZIANI O.S., FLORES S.G., MOLTEDO H., DEROZIER C., GUGLIELMONE A.A., ZIMMERMAN G.A. & WANKER O. (2000). Persistent activity of doramectin and ivermectin in the prevention of cutaneous myiasis in cattle experimentally infested with *Cochliomyia hominivorax*. *Vet. Parasitol.*, **87**, 243–247.
5. ANZIANI O.S., GUGLIELMONE A.A. & SCHMID H. (1998). Efficacy of dicyclanil in the prevention of screwworm infestation (*Cochliomyia hominivorax*) in cattle castration wounds. *Vet. Parasitol.*, **76**, 229–232.
6. BAUMHOVER A.H. (2001). A personal account of programs to eradicate the screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, in the United States and Mexico with special emphasis on the Florida program. *Florida Entomologist*, **84**, 162 (Abstract only, full text online at www.fcla.edu/FlaEnt/fe84p162a.pdf).
7. BENITEZ USHER C., CRUZ J., CARVALHO L., BRIDI A., FARRINGTON D., BARRICK R.A. & EAGLESON J. (1997). Prophylactic use of ivermectin against cattle myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858). *Vet. Parasitol.*, **72**, 215–220.
8. BROCE A.B., GOODENOUGH J.L. & COPPEDGE J.R. (1977). A wind-oriented trap for screwworm flies. *J. Econ. Entomol.*, **70**, 413–416.
9. BROWN W.V., MORTON R., LACEY M.J., SPRADBERY J.P. & MAHON R.J. (1998). Identification of the geographical source of adults of the Old World screw-worm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera: Calliphoridae), by multivariate analysis of cuticular hydrocarbons. *Comp. Biochem. Physiol.*, **119 B**, 391–399.
10. CAPRONI L. JR., UMEHARA O., GONCALVES L.C.B. & MORO E. (1998). Persistent efficacy of doramectin and ivermectin in the prevention of natural *Cochliomyia hominivorax* infestations in cattle castrated 10 days after treatment. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, **7**, 57–61.
11. DEAR J.P. (1985). A revision of the New World Chrysomyini (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Zool.*, **3**, 109–169.
12. DYCK V.A., REYES FLORES J., VREYSEN M.J.B., REGIDOR FERNÁNDEZ E.E., TERUYA T., BARNES B., GÓMEZ RIERA P., LINDQUIST D. & LOOSJES M. (2005). Management of area-wide integrated pest management programmes that integrate the sterile insect technique. In: *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*, Dyck V.A., Hendrichs J. & Robinson A.S., eds. Springer, Dordrecht, the Netherlands, 525–545.
13. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1991). Manual for the Control of the Screwworm Fly, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel). FAO, Rome, Italy, 93 pp.
14. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1992). The New World Screwworm Eradication Programme. FAO, Rome, Italy, 192 pp.
15. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1993). Manual for the Control of the Screwworm Fly, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel). Volume 2. Guide for the Identification of Flies in the genus *Cochliomyia* (Diptera: Calliphoridae). FAO, Rome, Italy, 18 pp.

³ Pour plus d'informations contacter : USDA/APHIS, 4700 River Road, Riverdale, Maryland 20737, USA.

⁴ Pour plus d'informations contacter : Institut Haiwan, Box 520, 86009 Kluang, Johor, Malaysia.

16. GRAHAM O.H. (1979). The chemical control of screwworms: a review. *Southwest. Entomol.*, **4**, 258–264.
17. GRAHAM O.H., ED. (1985). Symposium on eradication of the screwworm from the United States and Mexico. *Miscell. Pub. Entomol. Soc. Am.*, **62**, 1–68.
18. GUIMARAES J.H. & PAPAVERO N. (1999). Myiasis in man and animals in the Neotropical Region: Bibliographic database. PIêade/FAPESP, São Paulo, Brazil, 308 pp.
19. HALL M.J.R. (1995). Trapping the flies that cause myiasis: their responses to host-stimuli. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **89**, 333–357.
20. HALL M.J.R., EDGE W., TESTA J., ADAMS Z.J.O. & READY P.D. (2001). Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, occurs as two geographical races. *Med. Vet. Entomol.*, **15**, 393–402.
21. HALL M.J.R. & SMITH K.G.V (1993). Diptera causing myiasis in man. In: Medical Insects and Arachnids, Lane R.P. & Crosskey R.W., eds. Chapman & Hall, London, UK, 429–469.
22. JAMES M.T. (1947). The Flies that Cause Myiasis in Man. United States Department of Agriculture Miscellaneous Publication No. 631, USDA, 175 pp.
23. KITCHING R.L. (1974). The immature stages of the Old-World screw-worm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve, with comparative notes on other Australasian species of *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae). *Bull. Entomological Res.*, **66**, 195–203.
24. LAAKE E.W., CUSHING E.C. & PARISH H.E. (1936). Biology of the Primary Screwworm Fly, *Cochliomyia americana*, and a Comparison of its Stages with those of *C. macellaria*. United States Department of Agriculture, Technical Bulletin No. 500, USA, 24 pp.
25. LIMA W.S., MALACCO M.A.F., BORDIN E.L. & OLIVEIRA E.L. (2004). Evaluation of the prophylactic effect and curative efficacy of fipronil 1% pour on (Topline ®) on post-castration scrotal myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle. *Vet. Parasitol.*, **125**, 373–377.
26. LINDQUIST D.A., ABUSOWA M. & HALL M.J.R. (1992). The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Med. Vet. Entomol.*, **6**, 2–8.
27. LITJENS P., LESSINGER A.C., DE AZEREDO-ESPIN A.M.L. DE (2001). Characterization of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Med. Vet. Entomol.*, **15**, 183–188.
28. LOMBARDEO O.J., MORIENA R.A., RACIOPPI O., BILLAUDOTS A. & MALIANDI F.S. (1999). Comparacion de la accion curativa y preventiva de la ivermectina y doramectina en la miasis umbilical de terneros con infestacion natural, en Corrientes (Argentina). *Veterinaria Argent.*, **16**, 588–591.
29. MACKLEY J.W. & BROWN H.E. (1984). Swormlure-4: a new formulation of the Swormlure-2 mixture as an attractant for adult screwworms, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *J. Econ. Entomol.*, **80**, 629–635.
30. MALLON P.W.G., EVANS M., HALL M. & BAILEY R. (1999). Something moving in my head. *Lancet*, **354**, 1260.
31. MOYA-BORJA G.E., MUNIZ R.A., UMEHARA O., GONCALVES L.C.B., SILVA D.S.F. & MCKENZIE M.E. (1997). Protective efficacy of doramectin and ivermectin against *Cochliomyia hominivorax*. *Vet. Parasitol.*, **72**, 101–109.
32. MOYA-BORJA G.E., OLIVEIRA C.M.B., MUNIZ R.A. & GONCALVES L.C.B. (1993). Prophylactic and persistent efficacy of doramectin against *Cochliomyia hominivorax* in cattle. *Vet. Parasitol.*, **49**, 95–105.
33. MUNIZ R.A., CORONADO A., ANZIANI O.S., SANVARIA A., MORENO J., ERRECALDE J. & GONCALVES L.C.B. (1995). Efficacy of injectable doramectin in the protection of castrated cattle against field infestations of *Cochliomyia hominivorax*. *Vet. Parasitol.*, **58**, 327–333.
34. NAVIDPOUR SH., HOGHOOGHI-RAD N., GOODARZI H & POOLADGAR A.R. (1996). Outbreak of *Chrysomya bezziana* in Khoozestan province, Iran. *Vet. Rec.*, **139**, 217.

35. NG K.H.L., YIP K.T., CHOI C.H., YEUNG K.H., AUYEUNG T.W., TSANG A.C.C., CHOW L. & QUE T.L. (2003). A case of oral myiasis due to *Chrysomya bezziana*. *Hong Kong Med. J.*, **9**, 454–456.
36. PARMAN D.C. (1945). Effect of weather on *Cochliomyia americana* and a review of methods and economic applications of the study. *J. Econ. Entomol.*, **38**, 66–76.
37. PERKINS I.D. (1987). Use of insecticides to control screwworm fly strike by *Chrysomya bezziana* in cattle. *Aust. Vet. J.*, **64**, 17–20.
38. SIDDIG A., AL JOWARY S., AL IZZI M., HOPKINS J., HALL M.J.R. & SLINGENBERGH J. (2005). Seasonality of Old World screwworm myiasis in the Mesopotamia valley in Iraq. *Med. Vet. Entomol.*, **19**, 140–150.
39. SILVA D.J., VIANNA W.O., LOMBA F. & DA SILVA D.J. (1991). Insecticidas no controle de larvas de mosca da especie *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel). *Bol. Indust. Anim.*, **48**, 1–6.
40. SKODA S.R., PORNKULWAT S. & FOSTER J.E. (2002). Random amplified polymorphic DNA markers for discriminating *Cochliomyia hominivorax* from *C. macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Bull. Entomol. Res.*, **92**, 89–96.
41. SNYDER D.E., LOWE L.B., HACKET K.C., ROTHWELL J.T., ARANTES G., PEREZ-MONTIE H. & MAH C.K. (2005). Efficacy of a spinosad aerosol spray formulation against Old and New World screwworm infestations in cattle. *Proceedings of the 20th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, Christchurch, New Zealand, 16–20 October 2005, **20**, 122.
42. SPRADBERY J.P. (1991). A Manual for the Diagnosis of Screw-worm Fly. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) Division of Entomology, Canberra, Australia, 64 pp.
43. SPRADBERY J.P. (1994). Screw-worm fly: a tale of two species. *Agric. Zoo. Rev.*, **6**, 1–62.
44. SPRADBERY J.P., TOZER R.S., DREWETT N. & LINDSEY M.J. (1985). The efficacy of ivermectin against larvae of the screwworm fly (*Chrysomya bezziana*). *Aust. Vet. J.*, **62**, 311–314.
45. SPRADBERY J.P., TOZER R.S. & POUND A.A. (1991). The efficacy of insecticides against the screw-worm fly (*Chrysomya bezziana*). *Aust. Vet. J.*, **68**, 338–342.
46. SPRADBERY J.P., TOZER R.S., ROBB J.M. & CASSELLS P. (1989). The screw-worm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera: Calliphoridae) in a sterile insect release trial in Papua New Guinea. *Res. Pop. Ecol.*, **31**, 353–366.
47. SUTHERST R.W., SPRADBERY J.P. & MAYWALD G.F. (1989). The potential geographical distribution of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*. *Med. Vet. Entomol.*, **3**, 273–280.
48. SUKARSIH PARTOUTOMO S., SATRIA E., WIJFFELS G., RIDING G., EISEMANN C. & WILLADSEN P. (2000). Vaccination against the Old World screwworm fly (*Chrysomya bezziana*). *Parasite Immunol.*, **24**, 545–552.
49. TAYLOR D.B. & MANGAN R.L. (1987). Comparison of gelled and meat diets for rearing screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), larvae. *J. Econ. Entomol.*, **80**, 427–432.
50. TAYLOR D.B., SZALANSKI A.L. & PETERSON R.D. II (1996). Identification of screwworm species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Med. Vet. Entomol.*, **10**, 63–70.
51. THOMAS D.B. & MANGAN R.L. (1989). Oviposition and wound-visiting behaviour of the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **82**, 526–534.
52. THOMAS D.B. & PRUETT J.H. (1992). Kinetic development and decline of antiscrewworm (Diptera: Calliphoridae) antibodies in serum of infested sheep. *J. Med. Entomol.*, **29**, 870–873.
53. VREYSEN M.J.B., GERARDO-ABAYA J. & CAYOL J.P. (2007). Lessons from area-wide integrated pest management (AW-IPM) programmes with an SIT component: an FAO/IAEA perspective. In: *Area-Wide Control of Insect Pests. From Research to Field Implementation*, Vreysen M.J.B., Robinson A.S. & Hendrichs J., eds. IAEA, Springer, the Netherlands.
54. WARDHAUGH K.G., MAHON R.J. & BIN AHMAD H. (2001). Efficacy of macrocyclic lactones for the control of larvae of the Old World Screw-worm Fly (*Chrysomya bezziana*). *Aust. Vet. J.*, **79**, 120–124.

55. WYSS J.H. (2001). Screwworm eradication in the Americas. Proceedings of the 19th Conference of the OIE Regional Commission for Europe, Jerusalem (Israel), 19–22 September 2000, Office International des Epizooties, Paris, France, 239–244.
56. ZUMPT F. (1965). Myiasis in Man and Animals in the Old World. Butterworths, London, UK, 267 pp.

*
* *

N.B. : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la myiase à *Cochliomyia hominivorax* (voir le Tableau dans la Partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site web de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

PARATUBERCULOSE (Maladie de Johne)

RÉSUMÉ

La paratuberculose (Maladie de Johne) est une entérite chronique des ruminants causée par Mycobacterium avium subsp paratuberculosis (M. paratuberculosis) (49).

Identification de l'agent pathogène : *le diagnostic de la paratuberculose est divisé en deux parties : le diagnostic de la maladie clinique et la détection de l'infection subclinique. La dernière est essentielle pour le contrôle de la maladie sur le terrain, au niveau national ou international.*

Le diagnostic de la paratuberculose repose sur les signes cliniques confirmés par la mise en évidence de M. paratuberculosis dans les fèces par microscopie, par culture ou par l'utilisation de sondes ADN et la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR). Le diagnostic est fait à l'autopsie par la découverte de lésions pathognomoniques de la maladie dans les intestins, soit macroscopiques avec la démonstration d'organismes acido-alcool-résistants typiques sur frottis des lésions soit histologiquement et par isolement de M. paratuberculosis en culture.

La détection de l'infection subclinique repose sur la détection d'anticorps spécifiques par sérologie, ou la culture de M. paratuberculosis à partir des fèces ou des tissus récoltés à l'autopsie, ou la démonstration de la réponse à médiation cellulaire par l'utilisation de la recherche de l'interféron gamma. Le choix de l'épreuve dépend des circonstances et du degré de sensibilité requis au niveau individuel ou du troupeau.

La culture de M. paratuberculosis peut être obtenue à partir des fèces ou des tissus, après traitement pour éliminer les contaminants, par inoculation sur des milieux artificiels avec et sans le facteur de croissance spécifique, la mycobactine, qui est essentielle pour la croissance de M. paratuberculosis.

Épreuves sérologiques : *la difficulté du contrôle de la paratuberculose tient à la difficulté de diagnostic des infections à évolution prolongée et en général inapparentes, ainsi qu'à l'absence de tests de diagnostic permettant de détecter les animaux infectés sans symptômes.*

Les épreuves sérologiques communément utilisées pour la paratuberculose chez les bovins sont la fixation du complément (FC), la réaction immuno-enzymatique (ELISA) et l'immunodiffusion en gélose (IDG). La sensibilité et la spécificité sont souvent déterminées par référence aux résultats de la culture des fèces, qui a une sensibilité inconnue chez les bovins infectés subcliniquement. Quand elles sont utilisées pour confirmer le diagnostic de la paratuberculose chez des vaches ayant des signes cliniques typiques, certaines épreuves, par exemple le test de FC et l'ELISA absorbée, sont très performantes.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *les vaccins contre la paratuberculose peuvent être des bactéries vivantes atténuées ou tuées. Soit un adjuvant est incorporé dans les vaccins, soit ils sont lyophilisés et mis en présence d'un adjuvant lors de la reconstitution. La numération des bactéries est difficile et le contenu bactérien des vaccins peut être basé sur le poids, tandis que l'activité du vaccin peut être évaluée par l'analyse des lots en sensibilisant des cobayes.*

La sécurité des vaccins ou une toxicité anormale peuvent aussi être testées chez les cobayes.

Pour les épreuves cutanées, la tuberculine aviaire et la johnine sont des dérivés protéiques purifiés (PPD pour Purified Protein Derivatives) d'une culture de M. paratuberculosis ou de M. avium traitée par la chaleur, respectivement. Pour ce qui est du contenu en PPD, la johnine est normalisée par essai chimique et son activité biologique est identifiée chez des cobayes sensibilisés avec

M. paratuberculosis. L'activité de la tuberculine aviaire est déterminée chez des cobayes sensibilisés avec *M. avium* par comparaison avec une préparation de référence calibrée en unités internationales.

A. INTRODUCTION

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (*M. paratuberculosis*) est un organisme d'abord observé par Johne et Frothingham en 1895. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* cause la paratuberculose ou maladie de Johne, une infection intestinale granulomateuse. D'abord reconnue chez les bovins puis chez les moutons et plus tard chez les chèvres, la paratuberculose est trouvée le plus souvent chez les ruminants domestiques et sauvages et sa distribution est mondiale. La maladie a aussi été rapportée chez les chevaux, les porcs, les cerfs et les alpagas et récemment chez les lapins, l'hermine, le renard et la belette (3, 14). Dans les conditions naturelles, la maladie chez les bovins s'étend par ingestion de *M. paratuberculosis* à partir de l'environnement contaminé. La maladie persiste après l'introduction d'animaux infectés. L'infection peut se propager verticalement au fœtus (25) et les spermatozoïdes peuvent être infectés par l'organisme (46). La source primaire de l'infection chez les veaux est le lait de vaches infectées ou le lait qui est contaminé par les fèces de bovins malades.

L'identification de *M. paratuberculosis* repose sur son besoin en mycobactine et sa pathogénicité chez l'hôte. La dépendance en mycobactine a longtemps été utilisée comme un caractère taxonomique pour *M. paratuberculosis* car la plupart des mycobactéries sont capables de produire de la mycobactine par eux-mêmes. Cependant, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. silvaticum* et certains isollements primaires de *M. avium* n'ont pas cette capacité, et ils exigent de la mycobactine pour se développer au laboratoire. Aussi, l'exigence en mycobactine n'est pas limitée à *M. paratuberculosis* ; cette caractéristique existe à différents degrés au sein du groupe *M. avium* (48).

Les signes cliniques de la paratuberculose sont un amaigrissement lent et progressif et une diarrhée, qui est d'abord intermittente, devenant progressivement plus sévère jusqu'à être constamment présente chez les bovins (13). La diarrhée est moins commune chez les petits ruminants.

Les lésions précoces surviennent dans les parois de l'intestin grêle et les nœuds lymphatiques mésentériques drainant, l'infection étant limitée à ces sites pendant cette phase. Comme la maladie progresse, des lésions macroscopiques apparaissent dans l'iléon, le jéjunum, l'intestin grêle terminal, le caecum et le colon, et dans les nœuds lymphatiques mésentériques. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* est présent dans les lésions et dans tout le corps, à la phase terminale. Les lésions intestinales sont responsables d'une perte de protéine et d'un syndrome de malabsorption des protéines, qui conduit à une fonte musculaire. Les signes cliniques apparaissent habituellement d'abord chez les jeunes adultes, mais la maladie peut apparaître chez l'animal à n'importe quel âge pendant 1 à 2 ans.

Quelques semaines après l'infection, une phase de multiplication de *M. paratuberculosis* commence dans les parois de l'intestin grêle. Suivant la résistance de l'individu, l'infection est éliminée ou l'animal reste infecté comme porteur sain. La proportion des animaux dans cette catégorie est inconnue. Une phase plus tardive de multiplication des organismes chez une partie des porteurs conduit à l'extension des lésions, à des troubles du métabolisme de l'intestin et à des signes cliniques de la maladie. Les porteurs d'infection subclinique excrètent un nombre variable de *M. paratuberculosis* dans les fèces. Dans la plupart des cas, un plus grand nombre d'organismes est excrété du fait du développement de la maladie clinique.

L'hypersensibilité de type retardé (HSR) est détectable précocement au cours de l'infection et reste présente dans une proportion de porteurs infectés subcliniquement, mais comme la maladie progresse, l'HSR diminue et peut être absente dans les cas cliniques. Les anticorps sériques sont détectables plus longtemps que l'HSR. Ils peuvent aussi être présents chez les porteurs guéris. Les anticorps sériques sont présents plus constamment et ont des titres plus élevés quand les lésions deviennent plus étendues, reflétant la quantité d'antigène présente. Chez les moutons, il peut y avoir une réponse sérologique qui sera détectée au cours des infections riches en bacilles plutôt que dans celles avec peu de bacilles.

D'autres maladies et infections mycobactériennes, incluant la tuberculose bovine et aviaire, provoquent une HSR et la présence d'anticorps sériques. Il s'ensuit donc que ces maladies ont besoin d'être différenciées de la paratuberculose, cliniquement et par l'emploi d'épreuves de diagnostic spécifiques. L'exposition aux mycobactéries saprophytes de l'environnement peut aussi sensibiliser le cheptel, avec pour conséquence une réaction HSR non spécifique.

Les animaux vaccinés contre la paratuberculose développent une HSR et des anticorps sériques. La vaccination est une aide à la prévention de la maladie clinique, mais ne prévient pas nécessairement l'infection. Elle interfère aussi avec les programmes de diagnostic et de contrôle de la tuberculose bovine. Aussi, s'il est nécessaire de

faire un diagnostic de l'infection chez les animaux vaccinés, seules les épreuves pour détecter *M. paratuberculosis* dans les fèces peuvent être utilisées (21).

Chez les animaux individuels, surtout dans une ferme dans laquelle la maladie n'a pas encore été diagnostiquée, un essai de diagnostic clinique doit être confirmé par des épreuves de laboratoire. Cependant, un diagnostic définitif ne peut être garanti sur des signes cliniques seuls que si ceux-ci sont typiques et s'il est établi que la maladie est présente dans le troupeau. La confirmation de la paratuberculose dépend de la découverte soit de lésions macroscopiques avec démonstration d'organismes acido-alcool-résistants typiques sur un frottis, soit dans des lésions microscopiques pathognomoniques et l'isolement en culture de *M. paratuberculosis*.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Pour diagnostiquer la présence de paratuberculose chez un animal individuel cliniquement suspect, un certain nombre d'épreuves de laboratoire peut être utilisé comprenant : des frottis sur fèces, la culture de tissu et de fèces, les sondes ADN utilisant des fèces ou des tissus, la sérologie, l'autopsie et l'histologie.

Les tests sur troupeaux pour détecter l'infection subclinique sont effectués pour déterminer la prévalence de l'infection, habituellement afin des mesures de contrôle soient instituées. Comme aucune épreuve n'est sensible ou spécifique à 100 %, le contrôle de la maladie au moyen de réagissants positifs dépend de la répétition des épreuves à 6 mois ou 1 an d'intervalle sur un certain nombre d'années et l'élimination des réagissants aux épreuves sérologiques ou à l'excrétion fécale ; l'élimination de la descendance des femelles réagissantes est aussi considérée comme très prudente. Toutefois, même ces procédés ne sont pas toujours couronnés de succès sans changement dans l'hygiène et la conduite du troupeau afin de réduire la transmission de l'infection au sein du troupeau (2).

1. Identification de l'agent pathogène

a) Autopsie

La paratuberculose ne peut pas être diagnostiquée sur un examen superficiel des intestins pour observer des signes d'épaississement. Les intestins doivent être ouverts du duodénum au rectum pour exposer la muqueuse. Il n'y a pas toujours de corrélation étroite entre la sévérité des signes cliniques et l'étendue des lésions intestinales. La muqueuse, surtout celle de l'iléon terminal, est inspectée pour la corrugation et l'épaississement pathognomonique. Les lésions précoces sont observées en maintenant l'intestin à la lumière, quand des plaques discrètes peuvent être visualisées. Une hyperémie des muqueuses, des érosions et des pétéchies ont été observées chez les cerfs atteints par la paratuberculose. Les lésions les plus précoces sont un épaississement des nœuds et des vaisseaux lymphatiques. Les nœuds lymphatiques mésentériques sont généralement hypertrophiés et œdémateux. Les frottis de la muqueuse affectée et les sections des nœuds lymphatiques doivent être colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen et examinés au microscope pour les organismes acido-alcool-résistants, qui ont la morphologie caractéristique de *M. paratuberculosis*. Cependant, les organismes acido-alcool-résistants ne sont pas présents dans tous les cas. Le diagnostic est donc mieux confirmé par la récolte de multiples échantillons de paroi intestinale et de nœuds lymphatiques mésentériques fixés (solution de formol à 10 %) pour l'histologie. Les sections colorées par l'haematoxylin-éosine et les sections colorées par le Ziehl-Neelsen doivent être examinées. Les lésions typiques de la paratuberculose consistent en l'infiltration de la muqueuse et de la sous-muqueuse intestinales, des plaques de Peyer et du cortex des nœuds lymphatiques mésentériques par des grands macrophages, connus aussi en tant que cellules épithélioïdes, des cellules géantes multinucléées, dans lesquelles des bacilles acido-alcool-résistants disposés en amas ou isolés sont habituellement, mais pas toujours, trouvés.

b) Bactériologie (microscopie)

Les frottis de fèces ou de la muqueuse intestinale colorés par la coloration de Ziehl-Neelsen sont examinés au microscope. Un diagnostic de paratuberculose peut être fait si des amas (3 organismes ou plus) de bacilles petits (0,5 à 1,5 µm) fortement acido-alcool-résistants sont trouvés. En l'absence d'amas, le diagnostic est douteux lors de la présence de bacilles acido-alcool-résistants isolés. Les désavantages de cette épreuve sont qu'elle ne permet pas de différencier entre les différentes espèces de mycobactéries et que peu de cas seulement peuvent être confirmés sur l'examen microscopique d'un seul échantillon de fèces.

c) Bactériologie (culture)

L'isolement de *M. paratuberculosis* d'un animal apporte un diagnostic définitif. Bien que la culture prenne du temps et qu'elle soit techniquement délicate, elle est la seule à ne pas donner de résultat faussement positif (spécificité de 100 %).

La culture à partir de fèces est le meilleur test disponible pour le diagnostic de la paratuberculose chez les animaux vivants. La culture de fèces comprenant la méthode de double incubation pour assurer la décontamination des échantillons et la culture sur milieux solides est réputée détecter 30 à 40 % des bovins infectés (56). La culture des fèces permet de détecter la plupart des animaux en phase avancée de la maladie, mais dépiste peu les animaux en phase précoce de l'infection (56). Elle détecte les animaux infectés 6 mois ou plus avant l'apparition des symptômes, et sa sensibilité est proche de 100 % au cours de la phase clinique. La culture de tissus d'origine bovine ou caprine pour le diagnostic de *M. paratuberculosis* est plus sensible que l'examen histopathologique.

Il existe plusieurs méthodes de culture qui varient selon le milieu et les protocoles de traitement des échantillons. La culture de *M. paratuberculosis* est toujours réalisée en utilisant des milieux spéciaux supplémentés avec de la mycobactine J¹.

D'autres bactéries ou des champignons présents dans les fèces ou les tissus intestinaux cultivent beaucoup plus vite que *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. La réussite de l'isolement de *M. paratuberculosis* de tels échantillons repose sur une inactivation efficace de ces organismes indésirables. La meilleure méthode de décontamination doit avoir l'effet inhibiteur le plus faible possible sur la croissance de *M. paratuberculosis*. Il a été démontré que les protocoles de décontamination utilisés en routine entraînent une baisse du nombre de *M. paratuberculosis* isolés de 2,7 log₁₀ pour les échantillons de fèces et de 3,1 log₁₀ pour les tissus intestinaux (34).

Deux méthodes basiques sont utilisées pour la culture conventionnelle de *M. paratuberculosis* sur milieux solides : la méthode utilisant l'acide oxalique et la soude pour la décontamination et le milieu de Lowenstein-Jensen (LJ) pour la culture, et la méthode utilisant le CCP (chlorure de cétylpyridinium) pour la décontamination en combinaison avec le milieu de Herrold au jaune d'œuf (HEYM) pour la culture. Les deux milieux contiennent de la mycobactine. Bien qu'il ait été écrit que la croissance de *M. paratuberculosis* était nettement meilleure sur le milieu de Herrold que sur le milieu LJ (33), des études récentes ont montré que certaines souches poussaient mieux sur milieux LJ ou de Middlebrook (9).

En outre, il existe une technique de culture radiométrique dans laquelle la croissance de la bactérie en milieu liquide BATEC™ 12B (Middlebrook 7H12) supplémenté avec du jaune d'œuf et de la mycobactine, est mesurée par le relargage du ¹⁴C0₂ radioactif à partir du palmitate comme conséquence du métabolisme bactérien. Cette méthode réduit le délai pour obtenir un résultat et elle est considérée comme plus sensible que les méthodes de culture conventionnelles sur milieux solides, en ce qui concerne à la fois les souches bovines et ovines de *M. paratuberculosis* (11, 58). Le protocole de décontamination comprenant la double incubation des échantillons de fèces dans le CCP et un mélange d'antibiotiques peut aussi améliorer la sensibilité de la culture (11). Cependant comme le système BACTEC™ est basé sur la radiométrie, il n'est pas réalisable dans de nombreux laboratoires et a été occulté par les autres méthodes. L'évaluation de la faisabilité de systèmes de culture alternatifs basés sur des milieux liquides tels que MGIT (Becton Dickinson) ESPII (Difco) et MB/BacT Alert (Organon Teknika) et qui n'utilisent pas de produits radioactifs, est actuellement en cours.

Les premières colonies de *M. paratuberculosis* sur milieux solides peuvent apparaître à tout moment entre 5 semaines et 6 mois après l'ensemencement (7). Les souches ovines, y compris les types rares pigmentés en jaune brillant, cultivent moins bien que les souches bovines sur les milieux classiquement utilisés comme les milieux HEYM ou LJ, et les cultures primaires ne doivent être écartées qu'après une incubation prolongée. Le milieu solide Middlebrook 7H10 et le milieu liquide BACTEC™ 12B, tous les deux supplémentés avec du jaune d'œuf et de la mycobactine, sont excellents pour la culture des souches ovines de *M. paratuberculosis* (58).

Les colonies primaires des souches bovines de *M. paratuberculosis* sur milieu HEYM sont très petites, convexes (hémisphériques), molles, non muqueuses, et au moins au début, non colorées et transparentes. Les colonies sont au début de la taille d'une tête d'épingle, et peuvent rester d'une taille allant de 0,25 à 1 mm ; elles tendent à rester petites quand elles sont nombreuses et sur une pente. Les colonies présentent des bords ronds et nets, et leur surface est lisse et brillante. Quand l'incubation se prolonge, les colonies deviennent plus grandes, surélevées, opaques colorées en blanc crémeux, beige ou chamois. Les colonies

¹ La mycobactine peut être obtenue commercialement (mycobactine J) auprès de Allied Monitor, P.O. Box 71, 201 Golden Drive, Fayette, MO 65248, États-Unis d'Amérique, ou de la Société Synbiotics, 299 av. Jean Jaurès, 69007 Lyon, France.

isolées plus vieilles peuvent atteindre 2 mm. La morphologie des colonies passent de lisse à rugueuse, et d'hémisphérique à mamelonnée (7, 47).

Sur le milieu modifié 7H10, les colonies de souches bovines sont moins convexes que celles sur milieu HEYM, spécialement pour les cultures âgées. Elles sont de la taille d'une tête d'épingle (diamètre de 1 mm environ), de couleur chamois, et seulement légèrement plus claires que le milieu. Les colonies des souches bovines sur milieu 7H10 sont plus difficiles à détecter à celles sur milieu HEYM. Les colonies des souches ovines de *M. paratuberculosis* sur milieu modifié 7H10 sont convexes, molles, humides, brillantes, de couleur allant de blanc à chamois, et très semblables à la couleur du milieu. Typiquement, la taille va de celle d'une tête d'épingle à 0,5 mm, mais peuvent atteindre 1 mm, et plus rarement 1,5 mm en cas d'un petit nombre de colonies fixé à une pente (7).

Les mycobactéries saprophytes peuvent avoir un aspect similaire sur les deux milieux mais apparaissent le plus souvent clairement après 5 à 7 jours (7).

Pour l'identification de *M. paratuberculosis*, un petit inoculum des colonies suspectes doit être ensemencé une deuxième fois sur le même milieu avec et sans mycobactine, pour vérifier la dépendance vis-à-vis de cette dernière. Comme la mycobactine est présente dans la paroi bactérienne, un inoculum trop important pourrait apporter suffisamment de mycobactine pour assurer la croissance de mycobactéries mycobactine-dépendantes sur des milieux qui n'en contiennent pas.

- **Milieux**

Exemples de milieux appropriés :

i) *Milieu de Herrold au jaune d'œuf avec mycobactine (28)*

Pour 1 litre de milieu : 9 g de peptone ; 4,5 g de chlorure de sodium ; 2,7 g d'extrait de bœuf ; 27 ml de glycérine ; 4,1 g de pyruvate de sodium ; 15,3 g de gélose ; 2 mg de mycobactine ; 870 ml d'eau distillée ; 6 jaunes d'œuf (120 ml) ; et 5,1 ml d'une solution aqueuse de vert malachite à 2 %. Mesurer les 6 premiers ingrédients et les dissoudre par chauffage dans l'eau distillée. Ajuster le pH du milieu liquide à 6,9-7,0 en utilisant de la soude à 4 % et tester pour s'assurer que le pH de la phase solide soit de 7,2 à 7,3. Additionner la mycobactine dissoute dans 4 ml d'alcool éthylique. Autoclaver à 121 °C pendant 25 min. Refroidir à 56 °C et ajouter aseptiquement les 6 jaunes d'œuf stériles² et la solution de vert malachite stérile. Agiter doucement et distribuer dans des tubes stériles

Il est possible d'ajouter 50 mg de chloramphénicol, 100 000 d'unités de pénicilline et 50 mg d'amphotéricine B.

ii) *Milieu de Dubos modifié (41)*

Pour 1 litre de milieu : 2,5 g d'acides casamine Difco ; 0,3 g d'asparagine ; 2,5 g de phosphate disodique anhydre ; 1 g de phosphate monopotassique ; 1,5 g de citrate de sodium ; 0,6 g de sulfate de magnésium cristallisé ; 25 ml glycérine ; 50 ml d'une solution à 1 % de Tween 80 ; et 15 g de gélose. Dissoudre chaque sel dans l'eau distillée avec un minimum de chauffage et compléter à 800 ml. Ajouter la mycobactine en solution alcoolique à 0,05 % (2 mg dissout dans 4 ml d'éthanol) chauffer le milieu à 100 °C à la vapeur, et ensuite stériliser par autoclavage à 115 °C pendant 15 min. Refroidir à 56 °C dans un bain d'eau, ajouter les antibiotiques (100 000 U de pénicilline ; 50 mg de chloramphénicol ; et 50 mg d'amphotéricine B et le sérum (200 ml de sérum bovin stérilisé par filtration à travers un filtre Seitz « EX » et inactivé par la chaleur à 56 °C pendant 1 h). Le milieu est conservé parfaitement mélangé et ensuite distribué dans des tubes stériles. Un avantage de ce milieu est qu'il est transparent ce qui facilite la détection précoce des colonies.

iii) *Milieu modifié de Middlebrook 7H10 (7)*

Pour préparer ce milieu, 19 g de gélose Middlebrook 7H10 (Difco), 1 g de casitone et 5 ml de glycérol sont mis en solution dans 900 ml d'eau ; la solution est autoclavée à 121 °C pendant 15 min puis refroidie à 58 °C. Les ingrédients suivants sont ajoutés de manière aseptique, le jaune d'œuf en dernier : 50 ml de PANTA PLUS (Becton Dickinson), 25 ml d'une solution de Mycobactin J (50 µg/ml), 100 ml de supplément ADC (Difco) et 250 ml de jaune d'œuf. Le mélange est soigneusement agité par un mouvement lent de rotation et distribué à raison de 10 ml dans des tubes stériles inclinés, afin de former une pente. Après un contrôle de stérilité, les milieux sont conservés à 4 °C.

2 Utiliser des œufs frais de moins de 2 jours d'un élevage qui n'a pas reçu d'antibiotiques. Avec une brosse, frotter les œufs avec de l'eau contenant un détergent. Rincer avec de l'eau et mettre les œufs dans de l'alcool à 70° pendant 30 min. Sécher entre deux serviettes stériles. Avec des pinces stériles, casser une extrémité de la coquille de l'œuf, faire un trou d'environ 10 mm, et enlever le blanc d'œuf avec les pinces et par gravité. Agrandir le trou et casser le jaune. Mélanger les jaunes d'œuf en faisant tourner les pinces et enlever le sac du jaune. Verser les jaunes d'œufs mélangés dans le milieu.

iv) *Flacons de BACTEC 12B (7)*

Dans chaque flacon, les suppléments suivants sont ajoutés afin d'obtenir une concentration finale de 0,8-1 µg/ml de Mycobactin J et au moins 16 à 17 % de jaune d'œuf dans un volume final de 5 ou 6 ml. Pour un volume de 6 ml, on ajoute 0,1 ml de Mycobactin J (50 µg/ml), 0,1 ml de PANTA PLUS, 1 ml de jaune d'œuf et 0,8 ml d'eau. Pour un volume de 5 ml, on ajoute 0,1 ml de Mycobactin J (50 µg/ml), 0,1 ml de PANTA PLUS et 0,8 ml de jaune d'œuf.

v) *Milieux de Middlebrook 7H9, 7H10 et 7H11 (Difco)*

Ces milieux enrichis en mycobactine dans les mêmes proportions que dans le milieu de Herrold peuvent aussi être utilisés. L'avantage de ces milieux est qu'ils sont transparents, ce qui facilite la détection des colonies.

vi) *Milieu de Löwenstein-Jensen avec ou sans mycobactine (20).*

- **Préparation de l'échantillon**

- *Procédé pour les échantillons de tissu*

Les conservateurs chimiques ne doivent pas être utilisés. Les tissus peuvent être congelés à –20 °C.

Pour éviter les contaminations, les fèces doivent être rincés à partir des portions du tractus digestif avant l'envoi au laboratoire.

i) *Méthode de digestion/sédimentation pour la décontamination des tissus*

Approximativement 4 g de muqueuse de la valvule iléo-cæcale ou 4 g de nœuds lymphatiques mésentériques sont placés dans un mixeur stérile contenant 50 ml de trypsine (2,5 %). Le mélange est ajusté à la neutralité en utilisant de la soude à 4 % et un papier pH, et agité pendant 30 min à la température du laboratoire sur un agitateur magnétique. Le mélange digéré est filtré sur une gaze. Le filtrat est centrifugé à approximativement 2 000 à 3 000 **g** pendant 30 min. Le surnageant liquide est décanté et mis de côté. Le culot est remis en suspension dans 20 ml de CCP à 0,75 % et maintenu sans remuer pendant 18 h à la température du laboratoire. Les particules qui se déposent dans le fond du tube vont être utilisées comme inoculum et prélevées à la pipette sans remuer le surnageant liquide. D'autres méthodes de décontamination peuvent aussi être utilisées, tel que le traitement avec l'acide oxalique à 5 %.

ii) *Méthode de double incubation pour la décontamination des tissus (7)*

Environ 2 g d'un prélèvement de tissu (dont la graisse a été enlevée) sont finement hachés à l'aide d'une lame de scalpel ou d'une paire de ciseaux puis homogénéisés dans un Stomacher pendant 1 min dans 25 ml d'une solution à 0,75 % de CCP. L'échantillon est laissé au repos pour permettre la dissipation de la mousse et le dépôt des gros morceaux. Le surnageant homogénéisé est versé dans un tube à centrifuger en évitant la graisse et les gros morceaux de tissu. Laisser décanter pendant 30 min et prélever 10 ml de la suspension juste au-dessus du sédiment et les verser dans un tube de 30 ml puis incubé pendant 3 h à 37 °C. Centrifuger pendant 30 min à 900 **g**, éliminer le surnageant et remettre le culot en suspension dans 1 ml d'un cocktail antibiotique contenant 100 µg de chacun des antibiotiques suivants : vancomycine, amphotéricine et acide nalidixique (VAN). Incuber 1 nuit à 37 °C. La suspension est utilisée pour ensemercer les milieux comme cela est décrit ci-dessous.

iii) *Ensemencement des milieux de culture et incubation*

Approximativement 0,1 ml d'inoculum est transféré sur chacune des 3 pentes du milieu de Herrold contenant de la mycobactine et 1 pente de milieu de Herrold sans mycobactine. L'inoculum est distribué uniformément sur la surface des pentes. Les tubes sont laissés dans une position inclinée à 37 °C pendant environ 1 semaine avec les capsules à vis desserrées. Les tubes sont remis dans une position verticale quand l'humidité des pentes s'est évaporée. Les capsules sont resserrées et les tubes sont placés dans des paniers dans une étuve à 37 °C.

Les œufs dans le milieu de Herrold contribuent, grâce à suffisamment de phospholipides, à neutraliser l'activité bactéricide du CCP résiduel de l'inoculum. Les autres milieux (Dubos modifié et Middlebrook) n'ont pas cette propriété. D'autres traitements peuvent être utilisés pour la décontamination des échantillons, par exemple l'acide oxalique à 5 %.

Le CCP est relativement inefficace dans le contrôle du développement des contaminants fongiques. L'amphotéricine B (fungizone) permet de contrôler efficacement l'envahissement fongique des milieux ensemencés (31). La fungizone peut être incorporée dans le milieu de Herrold à une concentration finale de 50 µg par ml de milieu. En raison de la perte d'activité fongique, le stockage des milieux de Herrold contenant de la fungizone doit être limité à 1 mois à 4 °C.

Les pentes sont incubées pendant au moins 4 mois et observées toutes les semaines à partir de la 6^e semaine.

- *Procédé pour les échantillons de fèces*

Aucun conservateur chimique n'est utilisé. Les échantillons de fèces peuvent être congelés à -70°C .

- i) *Suspension et décontamination des fèces*

1 g de fèces est transféré dans un tube de 50 ml contenant 20 ml d'eau distillée stérile. Le mélange est agité pendant 30 min à la température du laboratoire. Les particules les plus grosses sont décantées pendant 30 min. 5 ml de la phase supérieure de la suspension de fèces sont transférés dans un tube de 50 ml contenant 20 ml de HPC. Le tube est retourné plusieurs fois pour assurer une distribution uniforme et maintenu sans remuer pendant 18 h à la température du laboratoire.

- ii) *Ensemencement des milieux de culture*

0,1 ml de sédiment non agité est transféré sur chacune des 4 pentes de milieu de Herrold, 3 avec mycobactine et 1 sans mycobactine. Un frottis peut être réalisé à partir du sédiment et coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen.

- iii) *Incubation et observation des pentes*

La même que pour les échantillons de tissus.

Des variations dans les méthodes ci-dessus ont été décrites (4, 24, 30, 35, 40, 54, 55). La sensibilité de la culture peut être améliorée en utilisant des milieux liquides et la centrifugation plutôt que la sédimentation. La méthode de double incubation décrite par Whitlock *et al.* (55) aide à la décontamination de l'inoculum (43) et donne une plus grande sensibilité que les méthodes de sédimentation ou de filtration (11). La méthode de double incubation consiste à mélanger 2 g de fèces dans 15 ml de sérum physiologique ou d'eau, puis à laisser sédimenter pendant 30 min ; les 5 ml qui surnagent sont transférés (en évitant les débris fibreux) dans 25 ml d'un bouillon cœur-cerveau (Difco) dilué de moitié et contenant 0,9 % de CCP. Après incubation à 37°C pendant 16 à 24 h, le mélange est centrifugé à 900 *g* pendant 30 min à température ambiante puis le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension dans 1 ml de cocktail antibiotique VAN. Le mélange est incubé pendant 24 à 72 h à 37°C et utilisé pour ensemercer les milieux comme décrit ci-dessous (7).

d) Sondes ADN et réaction d'amplification en chaîne par polymérase

Les sondes ADN sont développées ce qui permet de détecter *M. paratuberculosis* dans des échantillons et d'identifier rapidement des isolats bactériens (12, 29). Elles ont été utilisées pour distinguer *M. paratuberculosis* des autres mycobactéries.

McFadden *et al* ont identifié une séquence (26, 27), nommé IS900, qui est une séquence d'insertion spécifique pour *M. paratuberculosis*. Il a été rapporté qu'un petit nombre d'isolats autres que *M. paratuberculosis* ont donné des produits amplifiés de même taille que ceux attendus pour *M. paratuberculosis*. La digestion par une enzyme de restriction peut être appliquée à des produits IS900 positifs pour confirmer que leur séquence est compatible avec *M. paratuberculosis* (6).

L'identification de nouvelles séquences d'ADN considérées comme étant spécifiques de *M. paratuberculosis*, les séquences ISMav2, f57 et ISMap02, offre de nouvelles opportunités pour une identification rapide de ce microorganisme en utilisant la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) (44, 45, 51). L'analyse par enzymes de restriction de IS1311, une séquence d'insertion commune à *M. avium* et *M. paratuberculosis* peut être utilisée pour distinguer entre ces espèces et aussi pour le typage des souches ovines, bovines et de bison de *M. paratuberculosis* (38, 57).

L'utilisation de IS900 comme sonde pour l'identification spécifique de *M. paratuberculosis* dans les échantillons de fèces chez les bovins par PCR a été décrite (52). Des kits de diagnostic commercialisés pour la détection de *M. paratuberculosis* dans le lait et les fèces ont été mis au point.

2. Épreuves sérologiques

Les épreuves sérologiques communément utilisées pour la paratuberculose chez les bovins sont la fixation du complément (FC), la réaction immuno-enzymatique (ELISA) et l'immunodiffusion en gélose (IDG) (42) correspondant à l'immunité humorale, et l'interféron gamma correspondant à l'immunité cellulaire.

a) Le test de fixation du complément

Le test de FC a été le test de référence utilisé chez les bovins pendant de nombreuses années. Le test de FC donne de bons résultats chez les animaux cliniquement suspects, mais il n'a pas une spécificité suffisante pour permettre son utilisation sur l'ensemble du cheptel dans un but de contrôle. Néanmoins, il est souvent demandé par les pays qui importent des bovins. Des techniques variées du test de FC sont

utilisées internationalement. Un exemple de microméthode pour réaliser la fixation du complément est donné ci-dessous :

- i) L'antigène est un extrait aqueux de bactérie à partir duquel les lipides ont été éliminés (souche *M. paratuberculosis* 316F). *M. avium* D9 peut aussi être utilisée.
- ii) Tous les sérums sont inactivés dans un bain-marie à 60 °C pendant 30 min et dilués à 1/4, 1/8, et 1/16. Un sérum témoin positif et un sérum témoin négatif doivent être inclus dans chaque plaque. Les témoins suivants sont aussi préparés : un témoin antigène, un témoin complément et un témoin du système hémolytique.
- iii) Reconstitué, le complément lyophilisé est dilué pour contenir 6 fois H₅₀ (50 % d'hémolyse) comme il est calculé par titrage de l'antigène.
- iv) Les hématies de mouton ; 2,5 %, sont sensibilisées avec 2 unités de H₁₀₀ d'hémolysine.
- v) Toutes les dilutions et réactifs sont préparés dans du tampon véronal calcium/magnésium ; un volume de 25 µl de chaque réactif est utilisé dans des plaques de microtitration à fond rond de 96 puits.
- vi) La première incubation est à 4 °C pendant une nuit et la seconde incubation est à 37 °C pendant 30 min.
- vii) *Lecture et interprétation des résultats* : les plaques peuvent être laissées pour sédimenter ou centrifugées et lues comme suit : 4+ = 100 % de fixation, 3+ = 75 % de fixation, 2+ = 25 % de fixation et 0 = hémolyse complète. Le titre du sérum testé est donné comme la réciproque de la dilution la plus élevée du sérum donnant 50 % de fixation. Une réaction de 2+ à 1/8 est considérée comme positive. Les résultats doivent être interprétés en relation avec les signes cliniques et autres observations du laboratoire.

b) Méthode immuno-enzymatique

L'ELISA est, à présent, l'épreuve la plus sensible et la plus spécifique pour les anticorps sériques de *M. paratuberculosis* chez les bovins. Sa sensibilité est comparable à celle de la fixation du complément dans les cas cliniques, mais est plus grande que celle de la fixation du complément chez les porteurs infectés subcliniquement. La spécificité de l'ELISA est augmentée par l'absorption des sérums par *M. phlei*. L'ELISA absorbé, étudié par Yokomizo *et al* (61, 62) et modifié par Milner *et al* (32) a été développé dans un kit de diagnostic commercialisé par Cox *et al* (8).

L'ELISA détecte environ 30 à 40 % des bovins reconnus infectés en culture de fèces sur milieux solides (56). Comme pour les méthodes de culture, la sensibilité de l'ELISA dépend du nombre de *M. paratuberculosis* dans les fèces et de l'âge de l'animal. Une étude de grande envergure conduite en Australie a montré que la sensibilité de l'ELISA chez des bovins âgés de 2, 3 et 4 ans était respectivement de 1,2 %, 8,9 % et 11,6 %, mais restait de 20 à 30 % chez les classes d'âge plus élevées (22). La sensibilité globale pour toutes les classes d'âge a été estimée à environ à 15 % (22, 56).

Chez les petits ruminants, le kit ELISA disponible dans le commerce avait une spécificité comprise entre 98,2 et 99,5 % (intervalle de confiance [IC] de 95 %) et détectait 35 à 54 % (IC = 95 %) des animaux ayant des preuves histologiques d'infection (18). Dans une autre étude, la spécificité estimée d'un ELISA fabriqué au laboratoire était de 99 % et sa sensibilité calculée sur la base de résultats histopathologiques était de 21,9 % (37).

L'ELISA absorbé combine la sensibilité de l'ELISA avec la spécificité additionnelle d'une étape d'absorption. Les sérums à être testés sont dilués avec du tampon contenant un antigène de *M. phlei* soluble avant d'être testés dans un ELISA indirect. Ce procédé élimine les réactions croisées des anticorps non spécifiques. Dans les premières versions, le sérum était absorbé avec *M. phlei* entier, qui était éliminé par centrifugation préalablement à l'épreuve.

Une plaque de microtitrage a été développée dans laquelle l'antigène de *M. paratuberculosis* tapisse les 96 puits de la plaque. Les échantillons sont dilués dans un diluant contenant *M. phlei* pour éliminer les réactions croisées. Pendant l'incubation des échantillons dilués dans les puits sensibilisés, les anticorps spécifiques de *M. paratuberculosis* forment un complexe avec les antigènes qui tapissent les parois. Après lavage le matériel non fixé est éliminé des puits, l'immunoglobuline anti-bovin marquée à la peroxydase de raifort (HPR) est ajoutée. Les réactions avec les immunoglobulines lient l'antigène à la phase solide. Le taux de conversion du substrat est proportionnel à la quantité d'immunoglobuline fixée. La couleur consécutive, mesurée (à 450 nm) avec un spectrophotomètre est proportionnelle à la quantité d'anticorps présent dans le sérum testé.

L'antigène utilisé pour sensibiliser les plaques ELISA est disponible commercialement

Une IgG anti-bovin marquée avec HRPO est utilisée comme conjugué. La solution chromogène du substrat est la benzidine tétraméthyl peroxyde hydrogène. Une solution de 0,5 M H₂SO₄ est utilisée pour stopper la réaction quand l'absorption du sérum témoin positif atteint un point prédéterminé.

Plusieurs kits de diagnostic ELISA absorbé sont disponibles dans le commerce. La méthode et les matériels nécessaires, l'interprétation des résultats et des calculs sont entièrement décrits dans les instructions accompagnant le kit de diagnostic commercialisé. Récemment, il a été signalé que plusieurs ELISA disponibles dans le commerce ont des sensibilités et des spécificités semblables (5). Certains kits de diagnostic disponible dans le commerce proposent une option pour réaliser l'épreuve sur des échantillons de lait. La spécificité des épreuves ELISA sur des laits de vache ou de chèvre s'est révélée semblable à celle de l'ELISA réalisé sur sérums, mais avec une moindre sensibilité (17, 36).

c) Épreuve d'immunodiffusion en gélose

L'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) est utile pour la confirmation de la maladie chez des bovins cliniquement suspects, des moutons et des chèvres (39). En Nouvelle Zélande et en Australie, il a été rapporté que l'IDG pratiquée sur des échantillons de petits ruminants présente une sensibilité et une spécificité légèrement supérieures à celles des épreuves ELISA (15, 18, 37). La spécificité et la sensibilité de l'IDG mesurées par rapport aux résultats histopathologiques étaient respectivement de 99 à 100 % (IC = 95 %) et de 38 à 56 % (IC = 95 %) (18).

L'antigène employé est un extrait protoplasmique brut d'une souche de laboratoire *M. avium* 18 (formellement *M. paratuberculosis* 18) préparé par destruction des cellules dans une presse hydraulique. Les cellules brisées sont centrifugées à 40 000 *g* pendant 2 h pour éliminer les débris de parois cellulaire et la fraction surnageante est conservée et lyophilisée. Cet antigène est remis en suspension dans l'eau à une concentration de 10 mg/ml.

L'agarose est dissoute dans du tampon barbital, à pH 8,6, contenant de l'azide de sodium, pour donner une concentration finale de l'agarose de 0,75 %. L'agarose peut être versée dans des boîtes de Petri ou sur des lames de verre. Les puits sont découpés suivant un modèle hexagonal. Les puits ont 4 mm de diamètre, séparés par 4 mm, et la gélose doit avoir 3 à 4 mm de profondeur. L'antigène est déposé au centre des puits. Les sérums à tester, les sérums témoins négatif et positif sont déposés dans les puits périphériques en alternance.

Les plaques sont incubées dans une chambre humide à température du laboratoire. Les gels sont examinés pour les lignes de précipitation après 24 et 48 h d'incubation. L'apparition d'une ou plusieurs lignes de précipitation clairement définies, montrant une identité avec celles du sérum témoin positif, avant ou à 48 h, constitue un résultat positif à l'épreuve. L'absence de ligne de précipitation est enregistrée comme un résultat négatif à l'épreuve. Des lignes non spécifiques peuvent apparaître.

Plusieurs variations de la méthode existent.

3. Épreuves pour l'immunité cellulaire

La détection d'une réponse systémique à médiation cellulaire est plus précoce que celle des anticorps. Il arrive donc fréquemment que les animaux légèrement infectés ne réagissant pas avec les tests sérologiques puissent présenter une réaction positive dans les épreuves qui mesurent l'immunité cellulaire.

a) Recherche de l'interféron gamma

L'essai repose sur la libération de l'interféron gamma à partir de lymphocytes sensibilisés pendant une période d'incubation de 18 à 36 h avec un antigène spécifique (tuberculine aviaire PPD [*Purified Protein Derivatives*], tuberculine bovine PPD ou la johnine) (60). La détection quantitative de l'interféron gamma bovin est effectuée avec un ELISA sandwich qui utilise 2 anticorps monoclonaux de l'interféron gamma bovin. Une épreuve de diagnostic commercialisée basée sur la détection de l'interféron gamma a été mise au point pour le diagnostic de la tuberculose bovine. La méthode et les matériels nécessaires sont entièrement décrits dans les instructions accompagnant le kit de diagnostic commercialisé. Ce test n'a pas été validé par le fabricant (Prionics, Suisse) pour le diagnostic de la paratuberculose. Les résultats obtenus par cette épreuve sont donc souvent difficiles à interpréter, en raison d'une absence d'accord sur les critères d'interprétation, ainsi que sur le type et la quantité d'antigènes à utiliser pour stimuler les lymphocytes circulants. Chez les bovins, la spécificité de cette épreuve variait de 67 à 94 % selon les critères d'interprétation retenus (23).

b) L'hypersensibilité de type retardé

L'épreuve cutanée pour l'hypersensibilité de type retardé (HSR) est une mesure de l'immunité cellulaire, mais elle a une valeur limitée. L'épreuve est effectuée par une injection intradermique de 0,1 ml d'antigène dans une zone tondue ou rasée, habituellement sur le côté du cou, au niveau du tiers moyen. Auparavant, la tuberculine PPD aviaire³ ou la johnine étaient utilisées à cet effet, et il était admis que la tuberculine aviaire et la johnine étaient de sensibilité et spécificité comparables. L'épaississement de la peau est mesuré avec un pied à coulisse avant et à 72 h après l'injection. Une augmentation de l'épaississement de la peau de plus de 2 mm doit être considérée comme indiquant la présence de HSR. Il faut noter que les réactions positives chez les cervidés peuvent prendre la forme de plaques diffuses plutôt qu'une inflammation circonscrite et discrète, rendant ainsi la lecture de l'épreuve plus difficile. La présence de n'importe quelle protubérance doit être considérée comme positive chez une espèce. Cependant, la sensibilisation au complexe *avium* est répandue chez les animaux, et ni la tuberculine aviaire ni la johnine ne sont hautement spécifiques (19). Par ailleurs, l'interprétation des tests cutanés est compliquée par le manque d'accord quant aux critères d'interprétation. Au cours d'une étude récente dans laquelle la johnine (ID-Lelystad, Lelystad, Pays-Bas) était employée pour tester des bovins, la spécificité du test cutané était de 88,8 % au seuil de 2 mm ou plus, de 91,3 % au seuil de 3 mm ou plus et de 93,5 % au seuil de 4 mm ou plus (23). L'effet de ces seuils sur la sensibilité n'a pas été étudié. La performance de ce test peut également être affectée de manière significative par des différences antigéniques mineures qui se produisent parfois entre différents lots d'antigènes. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour améliorer le test cutané.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Vaccins : les vaccins utilisés contre la paratuberculose sont : vivants, atténués, incorporés à de l'huile et de la pierre ponce ; lyophilisés, vivants, atténués, qui peuvent être associés à un adjuvant, par exemple, de l'huile après reconstitution ; et des bactéries tuées par la chaleur. Les vaccins peuvent être préparés à partir d'une souche de *M. paratuberculosis* 316F ou 2E (Weybridge) ou *M. paratuberculosis* 3 et 5 ou II (souches canadiennes) ou les 3 souches peuvent être utilisées. L'information ci-dessous s'applique à un vaccin vivant atténué avec de l'huile et de la pierre ponce comme adjuvant (10, 50, 59). La vaccination peut déterminer une réaction au site de l'injection. La vaccination peut aussi interférer avec les programmes d'éradication basés sur les épreuves immunologiques et l'élimination des animaux reconnus comme infectés ainsi qu'avec l'interprétation des épreuves cutanées de l'HSR pour la tuberculose bovine.

Produits de diagnostic : la johnine PPD est une préparation d'un produit de culture traitée par la chaleur et lysée de *M. paratuberculosis*. La tuberculine aviaire PPD est une préparation d'un produit de culture traitée par la chaleur et lysée de *M. avium* D4ER ou TB 56. Les détails sur la tuberculine aviaire PPD sont dans le Chapitre 2.3.6., « Tuberculose aviaire ». Les 2 préparations sont utilisées, par injection intradermique, pour révéler l'HSR comme un moyen d'identifier les animaux infectés ou sensibilisés avec *M. paratuberculosis*.

Les lignes directrices pour la production des vaccins vétérinaires sont données au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ici et au Chapitre 1.1.8. sont prévues pour être de type général et peuvent être complétées par des recommandations nationales et régionales.

1. Gestion des semences bactériennes**a) Caractéristiques de la semence bactérienne**

Vaccin : les souches de la semence doivent être d'un type courant, qui peut être vérifié par analyse génétique ou biotypage. Elles doivent avoir démontré leur innocuité quand elles sont administrées par la voie recommandée pour la vaccination destinée aux espèces cibles.

Johnine : les souches de *M. paratuberculosis* utilisées pour préparer la culture des germes doivent être identifiées par des tests génétiques ou de biotypage. Elles doivent être exemptes d'organismes contaminants.

3 La tuberculine aviaire peut être obtenue auprès de VLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, Royaume-Uni, ou de la Société Synbiotics, 299 av. Jean Jaurès, 69007 Lyon, France.

b) Méthode de culture

Vaccin : la culture de la semence peut être faite sur des pentes de pommes de terre partiellement immergées dans un milieu approprié, tel que le milieu synthétique de Reid⁴ (53). Les cultures peuvent être stockées lyophilisées. Les cultures actives sont normalement incubées à 37 °C.

Johnine : le substrat de la culture doit être capable de produire un produit exempt de substances connues pour provoquer des réactions toxiques ou allergiques. Un milieu approprié pour la culture de la semence est celui de Reid, solidifié avec 1,75 % de gélose, dans des tubes à vis. Les cultures peuvent aussi être stockées lyophilisées.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Vaccin : des tests de pureté doivent être effectués sur les cultures de la semence et la récolte finale par des frottis colorés.

Le vaccin doit être utilisé comme une partie d'un programme de contrôle et il ne permet pas à lui-même de donner une protection complète contre la maladie causée par *M. paratuberculosis* (59). Il y a habituellement un bon contrôle de la maladie clinique, mais l'infection subclinique persiste chez les troupeaux vaccinés, quoique à un niveau réduit. Le vaccin doit être administré aux animaux seulement au début de leur vie, ex. chez les veaux au cours du premier mois. Il doit être inoculé par voie sous-cutanée et il provoque un petit œdème inflammatoire. Celui-ci est graduellement remplacé par un nodule froid, indolore, fibrocaséux, qui varie en taille et qui peut persister pendant des années. La vaccination a été utilisée pour contrôler la maladie chez les moutons et les chèvres, y compris chez les plus vieux animaux. Pour obtenir les meilleurs résultats d'une campagne de vaccination, des mesures coordonnées de contrôle de la maladie doivent également être mises en place.

L'utilisation des vaccins peut interférer avec le résultat des épreuves cutanées pour la tuberculose et ceci doit être rappelé quand un programme de contrôle est planifié (16).

Johnine : les cultures doivent être vérifiées par des frottis colorés pour la présence d'organismes contaminants.

Pour tester la non sensibilisation, trois cobayes qui n'ont pas été préalablement traités avec un quelconque produit pouvant interférer avec l'épreuve, sont injectés par voie intradermique à trois reprises à 5 jours d'intervalle avec 0,01 mg de la préparation sous un volume de 0,1 ml. Chaque cobaye, de même que chacun des trois témoins qui n'ont pas été injectés antérieurement, est injecté par voie intradermique 15 à 21 jours après la 3^e injection avec la même dose de la même johnine. Les réactions des deux groupes de cobayes ne doivent pas être significativement différentes quand elles sont mesurées 24 à 48 h plus tard.

2. Méthode de fabrication

Vaccin : pour les lots de vaccin, les organismes peuvent être cultivés sur un milieu synthétique liquide, tel que le milieu synthétique de Reid. Les organismes poussent en formant une pellicule à la surface du liquide. Pour garantir une bonne surface, il est pratique d'utiliser des récipients tels que des flacons coniques contenant un tiers de leur volume nominal de milieu liquide. Ces flacons peuvent êtreensemencés directement à partir des milieux de culture à la pomme de terre, mais avec certaines souches, un ou plusieurs passages sur milieu liquide peuvent être nécessaires pour assurer la culture d'une pellicule adéquate pour le passage final du lot de vaccin. De tels passages doivent habituellement pendre place à 2 semaines d'intervalle car des périodes plus longues peuvent aboutir à une sur-maturation et au coulage de la pellicule. L'incubation se fait à 37 °C.

Pour préparer le vaccin, la croissance en pellicule à partir de cultures vieilles de 2 semaines de chaque souche incluse peut être séparée du milieu liquide par décantation, filtration et pression entre des tampons de papier

4 L-Asparagine, 5,0 g
Phosphate monopotassique (KH₂PO₄, anhydre), 2,0 g
Sulfate de Magnésium (MgSO₄·7H₂O), 1,0 g
Citrate d'Ammonium ([NH₄]3C₆H₅O₇), 2,0 g
Chlorure de Sodium, 2,0 g
Citrate de fer ammoniacal, 0,075 g
Dextrose monohydraté B.P., 10 g
Glycérol B.P., (48 ml), 60 g
Eau distillée qsp 1000 ml
pH (non ajusté), 5,6-5,8
Quand c'est nécessaire, le milieu ci-dessus est solidifié par l'addition de 1,5 % d'agarose (Difco). Stérilisé à 121 °C pendant 15 min

filtre. La culture humide de *M. paratuberculosis* est mélangée à un adjuvant, tel que la paraffine liquide, l'huile d'olive et la pierre ponce (10).

Johnine : la johnine pour l'épreuve de diagnostic cutanée est une PPD préparée à partir d'une ou plusieurs souches de *M. paratuberculosis* (disponibles à Weybridge ou au CDI, Lelystad, Pays-Bas). Elle peut être préparée par la méthode suivante.

Les souches de *M. paratuberculosis* sont cultivées en pellicule sur milieu liquide de Reid. Les cultures pour la production sont habituellement inoculées à partir d'ensemencement sur culture liquide plutôt que directement à partir d'ensemencement sur milieu solide (milieu synthétique de Reid). Les cultures pour la production sont incubées à 37 °C pendant 10 semaines.

À la fin de la période d'incubation, le milieu de culture a un pH d'environ 5 ; peu ou pas de johnine sera obtenu à moins que le pH ne soit augmenté, à environ 7,3 avant chauffage à la vapeur, en utilisant de la soude. Après mélange minutieux, les cultures sont chauffées à la vapeur pendant 3 h. Le volume des organismes tués est enlevé par filtration grossière et le filtrat est clarifié par plus de filtration. La protéine dans le filtrat est précipitée chimiquement avec de l'acide trichloracétique à 40 %, lavée, et redissoute (solvant alcalin). Le produit est stérilisé par filtration. Un conservateur antibactérien qui ne donne pas lieu à des réactions faussement positives, tel que le phénol (moins de 0,5 % [w/v]), peut être ajouté. De la glycérine (moins de 10 % [w/v]) peut être ajoutée comme stabilisateur. Le produit est distribué aseptiquement dans des récipients en verre stérile, qui sont ensuite scellés.

3. Contrôles en cours de fabrication

Vaccin : la croissance adéquate et la pureté de la culture doivent être vérifiées. La présence d'organismes contaminants peut être détectée par les tests de stérilité conventionnels sur les récoltes. Les tests pour les mycobactéries pathogènes sont effectués par injection de la culture humide, prise avant son mélange avec un adjuvant et dilué 10 fois dans du sérum physiologique, à deux cobayes, chacun recevant 1 ml. Ils sont observés pendant 8 semaines, sacrifiés humanement et examinés pour des lésions anormales.

Johnine : après la filtration finale la stérilité de chaque filtrat de la solution de PPD est contrôlée.

Les filtrats stériles sont analysés pour le contenu en protéine par la méthode de Kjeldahl (1). Le contenu en protéine est ajusté pour donner entre 0,475 et 0,525 mg/ml de protéine dans le produit final. Le pH est ajusté entre 6,5 - 7,5.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et d'absence de contamination peuvent être trouvés dans le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ». Les organismes du vaccin ne poussent pas normalement à un niveau détectable dans les tests conventionnels de stérilité.

b) Innocuité

Vaccin : ces tests sont normalement réalisés chez des animaux de laboratoire, bien que les tests multidoses chez les animaux cibles seraient aussi satisfaisants. Un test sur l'animal de laboratoire type serait comme suit. Pour un lot acceptable de vaccin, deux cobayes sont inoculés, par voie sous-cutanée, avec une fraction de la dose bovine prédéterminée pour donner un nodule mais pas de nécrose manifeste au site d'injection. Les animaux sont observés pendant 8 semaines, sacrifiés humanement et examinés pour les lésions anormales.

Johnine : 2 cobayes doivent être inoculés par voie sous-cutanée avec 0,5 ml de johnine à tester. Aucune lésion systémique locale significative ne doit être observée pendant 7 jours (1).

Les tests sur la johnine pour les mycobactéries vivantes peuvent être réalisés soit sur du matériel immédiatement avant qu'il soit distribué dans les derniers récipients, soit sur des échantillons pris à partir des derniers récipients eux-mêmes. Un échantillon d'au moins 10 ml doit être prélevé, et doit être injecté par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée à au moins 2 cobayes, en divisant le volume à tester à parties égales entre les cobayes. Il est souhaitable de prendre un échantillon plus important, à savoir 50 ml, et de concentrer les mycobactéries résiduelles par centrifugation ou par filtration sur membrane. Les cobayes sont observés pendant au moins 42 jours et des examens post-mortem sont effectués. Les lésions macroscopiques sont examinées au microscope et par culture.

c) Activité

Vaccin : comme les tests de protection apparaissent peu réalistes, un test de capacité sensibilisante peut être utilisé. Il peut être comparé au contenu bactérien basé sur le poids. Un test type doit être comme suit : les cobayes sont sensibilisés par injection intramusculaire de 0,5 ml d'une solution au 1/100 du vaccin à tester dans de la paraffine liquide. Les épreuves cutanées sont réalisées 6 semaines après la sensibilisation en utilisant des inoculations intradermiques de 0,2 ml d'au moins 3 séries de dilutions d'un antigène *M. paratuberculosis*, tel que la johnine PPD, les dilutions étant choisies pour donner des réactions de 8 mm à 25 mm de diamètre. Chaque cobaye reçoit plusieurs dilutions sur les flancs, leur distribution étant choisie suivant un carré latin. Après 24 à 48 h, les réactions cutanées sont mesurées. Une préparation de référence pour les épreuves de ce type n'a pas encore été totalement établie. La tuberculine aviaire PPD, d'unités internationales connues, peut être utilisée comme antigène cutané dans les épreuves de ce type pour s'assurer que le vaccin est capable de produire une sensibilisation adéquate (correspondant à la vaccination).

Johnine : l'activité de la johnine est actuellement déterminée par essai chimique pour les protéines en utilisant la méthode de Kjeldahl. Il est recommandé qu'une PPD contienne de $0,5 \pm 0,025$ mg/ml du produit final (1).

L'identité du matériel doit être confirmée par injection intradermique chez les cobayes sensibilisés par injection de *M. paratuberculosis* tués (100 mg de poudre de mycobactérie + 25 ml de vaseline + 100 mg de pierre ponce) 6 semaines avant.

Il est possible de réaliser un test d'activité en utilisant des dilutions de johnine chez les cobayes sensibilisés avec *M. paratuberculosis*, semblable aux tests pour l'activité des tuberculines bovine et aviaire, mais une préparation normalisée pour ce type de test n'a pas encore été totalement établie.

d) Durée de l'immunité

Vaccin : après vaccination à l'âge de 14-30 jours, les effets de la vaccination sont exprimés comme la réduction du taux d'animaux excréteurs parmi les animaux vaccinés comparée aux bovins non vaccinés (21).

Il y a normalement un bon contrôle de la maladie clinique, mais l'infection subclinique persiste à un niveau réduit. Les résultats favorables reflètent probablement une diminution de l'exposition à l'infection résultant d'une réduction du nombre des excréteurs lourds dans le troupeau.

e) Stabilité

Vaccin : le vaccin peut être stocké entre 2 et 8 °C pendant 9 à 12 mois sans perte d'activité. Il ne peut pas être congelé.

Johnine : la johnine doit être protégée de la lumière et stockée entre 2 et 8 °C. Dans ces conditions, elle conserve son activité pendant au moins 5 ans.

f) Agents de conservation

Un agent de conservation est normalement inclus pour les vaccins dans des récipients multidoses. Pour la johnine, la concentration du phénol utilisé est inférieure à 0,5 % (w/v). La concentration des agents de conservation dans le produit final et leur persistance pendant les étapes de la vie doivent être contrôlées.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Vaccin : le vaccin provoque des effets secondaires, la formation d'un nodule et une sensibilisation des animaux à l'épreuve à la tuberculine (15). Chez l'homme, des injections accidentelles de vaccin ont provoqué des réactions inflammatoires chroniques nécessitant un traitement chirurgical (21).

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir section C.4.b.

b) Activité

Voir section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANON (1985). Johnin purified protein derivative. British Pharmacopoeia (Veterinary), 184–185.
2. ARGENTE G. (1988). Utilisation de la culture fécale dans un plan de prévention de la paratuberculose dans 500 troupeaux; justifications techniques et économiques. *In: Second International Colloquium on Paratuberculosis*. Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, 94703 Maisons-Alfort Cedex, France, 30–35.
3. BEARD P.M., HENDERSON D., DANIELS M.J., PIRIE A., BUXTON D., GREIG A., HUTCHINGS M.R., MCKENDRICK I., RHIND S., STEVENSON K. & SHARP J.M. (1999). Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). *Vet. Rec.*, **145**, 612–613.
4. COLLINS M.T., KENEFICK K.B., SOCKETT D.C., LAMBRECHT R.S., McDONALD J. & JORGENSEN J.B. (1990). Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2514–2519.
5. COLLINS M.T., WELLS S.J., PETRINI K.R., COLLINS J.E., SCHULTZ R.D. & WHITLOCK R.H. (2005). Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12** (6), 685–692.
6. COUSINS D., WHITTINGTON R., MASTERS A., EVANS R. & KLUVER P. (1999). Investigation of false positives in the IS900 PCR for identification of *M. paratuberculosis*. Proceedings of the Sixth International Colloquium on Paratuberculosis, Melbourne, Australia. International Association for Paratuberculosis, 259–264 and *Mol. Cell. Probes*, **14**, 431–442.
7. COUSINS D.V., CONDRON R.J., EAMENS G.J., WHITTINGTON R.J. & DE LISLE G.W. Johne's disease. *In: Australian Standard Diagnostic Tests*. Sub-Committee on Animal Health Laboratory Standards. <http://www.scahls.org.au/asdt.htm>
8. COX J.C., DRANE D.P., JONES S.L., RIDGE R. & MILNER A.R. (1991). Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.*, **68**, 157–160.
9. DE JUAN L., ALVAREZ J., ROMERO B., BEZOS J., CASTELLANOS E., ARANAZ A., MATEOS A. & DOMINGUEZ L. (2006). Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72** (9), 5927–5932.
10. DOYLE T.M. (1945). Vaccination against Johne's disease. *Vet. Rec.*, **57**, 385–387.
11. EAMENS G.J., WHITTINGTON R.J., MARSH I.B., TURNER M.J., SAUNDERS V., KEMSLEY P.D. & RAYWARD D. (2000). Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet. Microbiol.*, **77** (3–4), 357–367.
12. ELLINGSON J.L.E., BOLIN C.A. & STABEL J.R. (1998). Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol. Cell. Probes*, **12**, 133–142.
13. GILMOUR N.J.L. (1954). *Mycobacterium paratuberculosis*. *In: Handbuch der Bakteriellen Infektionen bei Tieren*, Blobel H. & Schliesser T., eds. Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany, 281–313.
14. GREIG A., STEVENSON K., HENDERSON D., PEREZ V., HUGUES V., PAVLIK I., HINES M.E. 2ND, MCKENDRICK I. & SHARP J.M. (1999). Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1746–1751.
15. GWOZDZ J.M., THOMPSON K.G., MURRAY A., REICHEL M.P., MANKTELOW B.W. & WEST D.M. (2000). Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust. Vet. J.*, **78** (11), 779–783.
16. HALGAARD C. (1984). Adverse effects of vaccination against paratuberculosis: tuberculin sensitization and nodule formation. *In: Paratuberculosis: Diagnostic Methods, Their Practical Application and Experience with Vaccination*. Commission of the European Communities Agriculture Publication, Luxembourg, 145–153.

17. HENDRICK S., DUFFIELD T., LESLIE K., LISSEMORE K., ARCHAMBAULT M. & KELTON D. (2005) The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in dairy herds in Ontario. *Can. Vet. J.*, **46** (12), 1126–1129.
18. HOPE A.F., KLUVER P.F., JONES S.L. & CONDRON R.J. (2000). Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.*, **78** (12), 850–856.
19. INDERLIED C.B., KEMPER C.A. & BERMUDEZ L.E.M. (1993). The *Mycobacterium avium* complex. *Clin. Microbiol. Rev.*, **6**, 266–310.
20. JORGENSEN J.B. (1982). An improved medium for the culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from faeces. *Acta Vet. Scand.*, **23**, 325–335.
21. JORGENSEN J.B. (1984). The effect of vaccination on the excretion of *Mycobacterium paratuberculosis*. In: Paratuberculosis: Diagnostic Methods, Their Practical Application and Experience with Vaccination. Commission of the European Communities Agriculture Publication, Luxembourg, 131–136.
22. JUBB T.F., SERGEANT E.S., CALLINAN A.P. & GALVIN J. (2004). Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Aust. Vet. J.*, **82** (9), 569–573.
23. KALIS C.H., COLLINS M.T., HESSELINK J.W. & BARKEMA HW. (2003) Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet. Microbiol.*, **97** (1–2), 73–86.
24. LAGADIC M., LE MENEC M. & ARGENTE G. (1983). Techniques de culture de *Mycobacterium paratuberculosis* : leur utilisation en routine dans un laboratoire de diagnostic. *Recueil Med. Vet.*, **159**, 801–807.
25. LARSON A.B. & KOPECKY K.E. (1970). *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *Am. J. Vet. Res.*, **31**, 255–258.
26. MCFADDEN J.J., BUTCHER P.D., CHIODINI R. & HERMON-TAYLOR J. (1987). Crohn's disease – isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 796–801.
27. MCFADDEN J.J., BUTCHER P.D., THOMPSON J., CHIODINI R. & HERMON-TAYLOR J. (1987). The use of DNA probes identifying restriction fragment length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. *Mol. Microbiol.*, **1**, 283–291.
28. MERKAL R.S. (1970). Diagnostic methods for the detection of paratuberculosis (Johne's disease). In: Proceedings of the 74th Annual Meeting of the US Animal Health Association, 620–623.
29. MERKAL R.S. (1984). Paratuberculosis. In: The Mycobacteria: A Sourcebook, Kubica G.P. & Wayne L.G., eds. Marcel Dekker, New York, USA, 1237–1249.
30. MERKAL R.S., LARSEN A.B., KOPECKY K.E. & NESS R.D. (1968). Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **29**, 1533–1538.
31. MERKAL R.S. & RICHARDS W.D. (1972). Inhibition of fungal growth in the cultural isolation of mycobacteria. *Appl. Microbiol.*, **24**, 205–207.
32. MILNER A.R., MACK W.N., COATES K., WOOD P.R., SHELDRIK P., HILL J. & GILL I. (1988). The absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. In: Johne's Disease, Milner A. & Wood P., eds. CSIRO Publications, Melbourne, Australia, 158–163.
33. NIELSEN S.S., KOLMOS B. & CHRISTOFFERSEN A.B. (2004). Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media. *J. Appl. Microbiol.*, **96** (1), 149–153.
34. REDDAKLIF L.A., VADALI A. & WHITTINGTON R.J. (2003). The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Vet. Microbiol.*, **95** (4), 271–282.
35. RIDGE S.E. (1993). Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples by using elements of the Roche MB Check system. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 400–405.

36. SALGADO M., MANNING E.J. & COLLINS M.T. (2005). Performance of a Johne's disease enzyme-linked immunosorbent assay adapted for milk samples from goats. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17** (4), 350–354.
37. SERGEANT E.S., MARSHALL D.J., EAMENS G.J., KEARNS C. & WHITTINGTON R.J. (2003). Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.*, **61** (4), 235–248.
38. SEVILLA I., SINGH S.V., GARRIDO J.M., ADURIZ G., RODRIGUEZ S., GEJO M.V., WHITTINGTON R.J., SAUNDERS V., WHITLOCK R.H. & JUSTE R.A. (2005). Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24** (3), 1061–1066.
39. SHERMANN D.M., MARKHAM R.J.F. & BATES F. (1984). Agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **185**, 179–182.
40. SINGH S.N., MADDUX R.L. & KADEL W.L. (1991). Comparative evaluation of conventional sedimentation versus new double incubation culture method for the isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. In: Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Providence, USA, 84–93.
41. SMITH H.W. (1953). Modification of Dubos's media for the cultivation of *Mycobacterium johnei*. *J. Pathol. Bacteriol.*, **66**, 375–381.
42. SOCKETT D.C., CONRAD T.A., THOMAS C.D. & COLLINS M.T. (1992). Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1134–1139.
43. STABEL J.R. (1997). An improved method for the cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 357–380.
44. STABEL J.R. & BANNANTINE J.P. (2005). Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.*, **43** (9), 4744–4750.
45. STROMMINGER B., STEVENSON K. & GERLACH G.F. (2001) Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **196** (1), 31–37.
46. SWEENEY R.W., WHITLOCK R.H., BUCKLEY C.L & SPENCER P.A. (1995). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**, 488–493.
47. THOREL M.F. (1984). Identification of *Mycobacterium paratuberculosis*. In: Paratuberculosis: Diagnostic Methods, Their Practical Application and Experience with Vaccination. Commission of the European Communities Agriculture Publication, Luxembourg, 61–64.
48. THOREL M.F. (1991). Taxonomic and genomic research on mycobactin-dependent mycobacteria. In: Paratuberculosis: Diagnostic Methods, Their Practical Application and Experience with Vaccination. Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Orlando, Florida, USA, 222–235.
49. THOREL M.F., KRICHEVSKY M. & VINCENT LEVY-FREBAULT V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 254–260.
50. VALLEE H., RINJARD P. & VALLEE M. (1941). Sur la prémunition de l'entérite paratuberculeuse due au bacille de Johne. *Bull. Acad. Méd.*, **125**, 195–198.
51. VANSNICK E., DE RIJK P., VERCAMMEN F., GEYSEN D., RIGOUTS L. & PORTAELS F. (2004). Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, **100** (3–4), 197–204.
52. VARY C.P.H., ANDERSON P.R., GREEN E., HERMON-TAYLOR J. & MCFADDEN J.J. (1990). Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 268–275.

53. WATSON E.A. (1935). Tuberculin, johnin and mallein derived from non-protein media. *Can. J. Public Health*, **26**, 268–275.
54. WHIPPLE D.L., CALLIHAN D.R. & JARNAGIN J.L. (1991). Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardised procedure. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **3**, 368–373.
55. WHITLOCK R.H., ROSENBERGER A.E., SWEENEY R.W., HUTCHINSON L.J. (1991). Culture techniques and media constituents for the isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Providence, USA, 94–111.
56. WHITLOCK R.H., WELLS S.J., SWEENEY R.W. & TIEM J. VAN (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.*, **77**, 387–398.
57. WHITTINGTON R., MARSH I., CHOY E., COUSINS D. (1998). Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol Cell Probes.*, **12** (6), 349–358.
58. WHITTINGTON R.J., MARSH I., MCALLISTER S., TURNER M.J., MARSHALL D.J. & FRASER C.A. (1999). Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.*, **37** (4), 1077–1083.
59. WILESMITH J.W. (1982). Johne's disease: A retrospective study of vaccinated herds in Great Britain. *Br. Vet. J.*, **138**, 321–331.
60. WOOD P.R., BILLMAN-JACOB H., MILNER A.R. & CARRIGAN M. (1990). Serology and cellular assays for the diagnosis of mycobacterial infections in cattle. Proceedings of the Third international Colloquium on paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Providence, USA, 12–19.
61. YOKOMIZO Y., MERKAL R.S. & LYLE P.A.S. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 2205–2207.
62. YOKOMIZO Y., YUGI H. & MERKAL R.S. (1985). A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jpn J. Vet. Sci.*, **47**, 111–119.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la paratuberculose (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

FIÈVRE Q

RÉSUMÉ

*La fièvre Q est une zoonose présente dans la plupart des pays. L'homme contracte l'infection à partir des réservoirs animaux, surtout des ruminants domestiques. La fièvre Q est une maladie extrêmement infectieuse, qui est due à la multiplication de *Coxiella burnetii*, une petite bactérie pléomorphe mesurant 0,3 à 1,5 µm de long et 0,2 à 0,4 µm de large. La bactérie étant exclusivement intracellulaire, *C. burnetii* peut être cultivée seulement sur œufs embryonnés ou cultures de cellules ou, si nécessaire, sur animaux de laboratoire. Il existe deux formes antigéniques : la phase I pathogène, trouvée chez les animaux ou les individus infectés et la phase II avirulente, obtenue par passages répétés sur œufs embryonnés ou sur culture cellulaire. *C. burnetii* est un micro-organisme extrêmement dangereux et sa manipulation doit être réalisée dans des locaux répondant aux exigences de l'OIE pour le confinement de niveau 3 des agents pathogènes.*

Chez l'homme, la fièvre Q induit soit une forme aiguë (se limitant à un épisode fébrile, une pneumonie, une hépatite), soit une forme chronique sévère (endocardite) après une première infection qui peut passer inaperçue. La forme aiguë de la maladie guérit rapidement après une antibiothérapie appropriée, mais la forme chronique exige une thérapie antibiotique prolongée (durant 2 ans ou plus), couplée à un contrôle sérologique. Dans certains pays, un vaccin est disponible pour les personnes professionnellement exposées.

*Les signes cliniques de la fièvre Q chez le bétail se traduisent par des avortements, des mort-nés ou nouveau-nés affaiblis, des rétentions placentaires, des métrites et de l'infertilité. Chez les petits ruminants, la fièvre Q est souvent associée à des avortements sporadiques ou à des vagues d'avortements suivis par des périodes sans complications. L'infection à *Coxiella burnetii* persiste pendant plusieurs années et probablement tout au long de la vie de l'animal. Les moutons, les chèvres et les vaches sont des réservoirs essentiellement asymptomatiques, mais ils peuvent excréter un nombre important de bactéries lors de la parturition et, par intermittence, dans les différentes sécrétions et excréments. Les animaux domestiques, comme les chiens, les chats, les lapins, les oiseaux, etc., sont aussi sensibles à l'infection et devraient être considérés comme des sources possibles de contamination pour l'homme et les animaux.*

Identification de l'agent pathogène : *pour le diagnostic de laboratoire, le placenta, les écouvillons vaginaux, le foie, les poumons ou le contenu stomacal de l'avorton, le lait ou le colostrum, les matières fécales constituent des échantillons de choix.*

Les bactéries peuvent être visualisées sur des calques de tissus après coloration en utilisant un microscope avec un objectif à immersion. De par leurs propriétés acido-résistantes, les bactéries peuvent être colorées par plusieurs méthodes : les colorations de Stamp, Ziehl-Neelsen modifiée, Gimenez, Giemsa ou Koster modifiée. Leur mise en évidence présume de la présence de l'agent pathogène de la fièvre Q, mais couplé à des épreuves sérologiques, des observations cliniques et des recherches d'autres agents infectieux abortifs, cela peut être suffisant pour établir le diagnostic de la maladie au niveau d'un élevage ou d'un troupeau.

Jusqu'à aujourd'hui, la recherche de l'agent par immunohistochimie utilisant des anticorps spécifiques ou par amplification en chaîne par polymérase (PCR) s'est avérée être plus spécifique et plus sensible que les méthodes de colorations classiques. Aucun anticorps spécifique pour l'immunochimie n'est disponible dans le commerce, mais la PCR peut être réalisée dans les laboratoires convenablement équipés. La PCR est considérée comme une technique très utile pour tester un nombre d'échantillons grand et varié. En outre, les échantillons peuvent être inactivés à la chaleur, garantissant ainsi la sécurité du personnel de laboratoire.

Coxiella burnetii peut être isolée par l'inoculation des prélèvements sur cultures de cellules conventionnelles, sur œufs de poule embryonnés ou sur animaux de laboratoire. L'inoculation à des animaux de laboratoire (cobaye, souris, hamster) est utile dans les cas d'isolement à partir de tissus contaminés par d'autres micro-organismes ou pour obtenir des antigènes *Coxiella* de phase I.

Épreuves sérologiques : le diagnostic de fièvre Q s'appuie souvent sur la sérologie. Un certain nombre d'épreuves peuvent être utilisées, et particulièrement l'épreuve d'immunofluorescence indirecte, le test immuno-enzymatique (ELISA) et la réaction de fixation du complément. Actuellement, les épreuves disponibles dans le commerce permettent la détection d'anticorps anti-*C. burnetii* de phase II. La présence d'anticorps spécifiques de type IgG apporte la preuve d'une infection récente à *C. burnetii* ou d'une exposition passée.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : plusieurs vaccins inactivés contre la fièvre Q ont été développés, mais seuls les vaccins contenant ou préparés à partir d'antigènes de *C. burnetii* de phase I peuvent être considérés comme protecteurs. La vaccination annuelle répétée est recommandée dans les régions fortement infectées, et particulièrement chez les jeunes animaux.

Un vaccin de phase I inactivé est commercialisé en Slovaquie. Une étude récente a montré son efficacité sur les avortements mais également sur l'excrétion de *C. burnetii* chez des chèvres vaccinées gestantes et expérimentalement infectées ; cependant les données concernant sa sécurité ne sont pas disponibles.

A. INTRODUCTION

La fièvre Q est largement répartie à travers le monde à l'exception de la Nouvelle-Zélande. Bien que la fièvre Q soit présente pratiquement dans tout le « règne animal », arthropodes inclus, la maladie affecte surtout l'homme, le bétail, les moutons et les chèvres (27, 30). L'agent étiologique, *Coxiella burnetii*, est une bactérie intracellulaire Gram négatif, qui se multiplie dans le phagolysosome du phagocyte. Il a été historiquement classé dans la famille des *Rickettsiaceae* ; pourtant, des études phylogénétiques, basées surtout sur le séquençage des ARNr 16S, ont montré que le genre *Coxiella* est distant du genre *Rickettsia* dans la sous-division des alpha Protéobactéries (60). *Coxiella burnetii* a maintenant été classée dans la famille des *Coxiellaceae*, ordre des *Légionellales* de la sous-division des gamma Protéobactéries (26). Le génome complet de *C. burnetii* a été séquencé récemment et confirme sa classification systématique (47). À la différence des *Rickettsiae*, *C. burnetii* produit une forme semblable à une petite spore, dense, extrêmement résistante dans l'environnement ; cette propriété est importante dans la transmission (31). Cette capacité a été attribuée à l'existence de différentes formes de multiplication de *C. burnetii* : une grosse forme appelée LCV (pour « Large Cell Variant »), une forme de petite taille SCV (pour « Small Cell Variant ») et une petite forme dense SDC (pour « Small Dense Cell ») (10, 17, 48). Les formes SDC et SCV représentent probablement les formes extracellulaires de résistance de la bactérie. Une autre caractéristique essentielle est que *C. burnetii* peut se présenter sous deux formes antigéniques : une phase I pathogène, isolée d'animaux ou d'individus infectés et une phase II avirulente, obtenue *in ovo* ou *in vitro*. Cette variation de phase est liée à des modifications au niveau du LPS (lipopolysaccharide de surface) et intervient au cours des passages successifs sur cellules. Les bactéries en phase I, possédant un LPS complet, voient dans un premier temps la longueur de ces chaînes-O diminuées, pour passer ensuite à la phase II, avec un LPS tronqué. Cette variation de phase du LPS est accompagnée par une délétion permanente au niveau du chromosome, ce qui implique l'impossibilité de réversion de la phase II vers la phase I (56).

La fièvre Q est une zoonose. Chez l'homme, l'infection peut se rencontrer sous les formes aiguë, chronique et inapparente (38). Les formes aiguës incluent communément un épisode fébrile, une pneumonie et une hépatite granulomateuse. La principale manifestation clinique de la fièvre Q chronique est l'endocardite chez les patients atteints de valvulopathies. En absence d'un traitement antibiotique approprié, les complications de la forme chronique peuvent être sévères et même fatales (11). De plus, l'infection à *C. burnetii* chez les femmes enceintes peut provoquer une atteinte du placenta et entraîner des naissances prématurées, une diminution de la croissance, des avortements spontanés ou la mort du fœtus (36). L'infection est endémique dans certaines régions, avec des cas sporadiques ou des épidémies explosives. Son incidence est probablement plus importante que ce qui est annoncé. Les études épidémiologiques sur la fièvre Q suggèrent que l'infection est principalement transmise par l'inhalation de particules desséchées sous forme d'aérosols et par le contact avec des animaux infectés ou les produits de leur mises-bas (29, 30). La contamination par ingestion a été souvent suggérée, particulièrement lors de la consommation de produits laitiers produits à partir de lait cru contaminé et peut-être même après pasteurisation (16, 38, 53). La fièvre Q est très rarement transmissible d'homme à homme bien que l'infection pendant l'accouchement soit possible par transmission sexuelle et sanguine (12, 32). Chez les animaux, en plus des voies respiratoires et digestives, la transmission verticale et la transmission sexuelle peuvent se produire (25, 58). Les arthropodes, principalement les tiques, peuvent être impliqués dans la transmission de la fièvre Q.

Chez les vaches, les brebis et les chèvres, la fièvre Q a surtout été associée à des avortements tardifs et à des troubles de la reproduction comme les naissances prématurées, les fœtus morts ou affaiblis, les métrites et l'infertilité (27). Néanmoins, chez une espèce donnée les réponses sérologiques ou l'isolement de *C. burnetii* ne sont pas nécessairement en corrélation avec l'expression de la maladie clinique (18, 27, 44). En effet, l'agent pathogène peut persister chez les animaux infectés, et être excrété par intermittence dans le lait, les matières fécales, l'urine et peut être présent dans le sang. La bactérie peut être retrouvée en grande quantité dans les produits de la parturition (placenta, liquide amniotique et fœtus) et les animaux non gestants présentent un risque moins important. Les ruminants domestiques sont considérés comme les réservoirs principaux de *C. burnetii*, mais les chats, les chiens, les lapins, les oiseaux, etc., ont également été listés comme étant impliqués dans l'infection/maladie humaine (23, 29, 30, 51). Ainsi, les animaux domestiques et sauvages infectés peuvent disséminer la bactérie sans présenter les signes de la maladie et peuvent être considérés comme des sources possibles d'infection pour l'homme.

Les avortements chez les ruminants sont habituellement documentés afin de déterminer si la fièvre Q est présente et si elle peut affecter l'homme et d'autres animaux. Le diagnostic de la fièvre Q et d'autres maladies abortives, traditionnellement réalisé par microscopie sur des échantillons cliniques, couplée à des résultats sérologiques positifs, est en général fiable (27, 41, 43). Le diagnostic de la fièvre Q est également recommandé pour la surveillance épidémiologique de troupeaux « à risque » ainsi que dans les régions suspectes (après des cas récents chez l'homme ou les animaux), ou pour l'exportation. Cependant, l'identification des animaux excréteur *C. burnetii* ainsi que celle des porteurs asymptomatiques n'est actuellement pas pratiquée (4, 5, 7, 21).

Généralement, quand plusieurs animaux sont séropositifs, une intervention appropriée est conseillée. Les mesures doivent être adaptées selon la séoprévalence et le contexte épidémiologique. Une pasteurisation appropriée des produits laitiers doit être garantie (53). La quantité de bactéries peut être réduite dans l'environnement par le nettoyage régulier et la désinfection des installations accueillant les animaux, et en particulier les zones de parturition, en utilisant de l'eau de Javel à 10 %. Les animaux gestants doivent être gardés dans des enclos séparés et les placentas et avortons doivent être rapidement enlevés afin d'éviter qu'ils soient ingérés par les chiens, les chats ou la faune sauvage. L'épandage dans les zones suburbaines et les jardins des fumiers provenant de fermes contaminées doit être évité. Bien que l'efficacité de la fermentation du compost ou de la décontamination par traitement chimique (tel que 0,4 % cyanamide de calcium ou la chaux) pour inactiver *C. burnetii* nécessite d'être évaluée, ces méthodes sont toujours recommandées. Afin d'acquies et de maintenir le bétail indemne de *Coxiella*, l'introduction d'animaux, le regroupement de troupeaux, les contacts avec la faune sauvage et l'infestation par les tiques doivent être minimisés. Ces méthodes peuvent se révéler efficaces pour contrôler la maladie mais les animaux exposés resteront infectés. Bien que des vaccins vétérinaires contre la fièvre Q aient été développés, ils ne sont pas commercialement disponibles dans la plupart des pays.

Enfin, il est important de se souvenir que *C. burnetii* est extrêmement infectieuse pour l'homme et que les infections de laboratoire sont courantes. Du fait qu'elle peut entraîner une maladie incapacitante chez de nombreuses personnes, et étant donné son pouvoir infectieux, sa résistance dans l'environnement et sa transmission par voie aérienne, *C. burnetii* est considérée comme un agent potentiel de bioterrorisme et est classée par le CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) comme un agent du groupe B (9). Des précautions doivent être prises avec cet agent du groupe de risque 3. Les cultures vivantes ou le matériel contaminé provenant des animaux infectés doivent être manipulés uniquement au sein d'équipements qui permettent la maîtrise des agents pathogènes du Groupe 3 comme exposé dans le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries ».

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

La présence de *Coxiella burnetii* peut être démontrée par différentes méthodes, selon le type d'échantillon et l'objectif du diagnostic (11, 41, 43). Les échantillons peuvent être obtenus à partir d'avortons, de placenta et d'écoulements vaginaux juste après l'avortement ou la parturition. Le lait de mélange, le lait individuel ou le colostrum ainsi que les échantillons de matières fécales peuvent aussi être étudiés.

a) Coloration

Dans le cas d'une suspicion, des frottis sont préparés sur des lames de microscope à partir de cotylédons placentaires (42). Le poumon, le foie et le contenu stomacal de l'avorton ou les écoulements vaginaux peuvent être traités de la même manière. Ceux-ci peuvent être colorés selon plusieurs méthodes rapides : Stamp, Gimenez, Macchiavello, Giemsa et Koster modifiée (14, 35, 41, 42, 44). Les trois premières techniques donnent les meilleurs résultats. Ces techniques sont proches de la technique de Ziehl-Neelsen modifiée qui comprend de la fuschine basique pour colorer les bactéries. Par exemple, la coloration de Stamp est réalisée avec une solution à base de fuchsine 0,4 %, suivie d'une décoloration rapide avec une solution à

0,5 % d'acide acétique, et une contre-coloration avec une solution de 1 % de bleu de méthylène ou de vert malachite. Les colorations sont examinées au microscope avec un objectif à immersion ($\times 500$ ou plus). La coloration de Stamp est préférée dans les laboratoires vétérinaires tandis que la méthode de Gimenez est largement utilisée pour le diagnostic chez l'homme. La coloration de Gimenez est plus rapide car la solution acide n'est pas utilisée pour la différenciation. *Coxiella burnetii* est caractérisée par un très grand nombre de fines bactéries coccobacillaires colorées en rose sur un fond bleu ou vert. Elles peuvent parfois être difficiles à détecter en raison de leur petite taille ($0,3$ à $1,5 \mu\text{m}$ de long \times $0,2$ à $0,4 \mu\text{m}$ de large), mais ceci est généralement compensé par leur grand nombre ; souvent des inclusions dans les cellules hôtes apparaissent comme des masses rouges sur fond bleu ou vert. Il faut accorder une attention particulière à la lecture des lames car, au microscope, *C. burnetii* peut être confondue avec *Chlamydophila abortus* ou *Brucella* spp. Cependant, avec ces mêmes techniques de coloration, les chlamydia ont des contours plus nets, sont arrondies, petites et peuvent ressembler à des globules. Les brucella sont plus grandes ($0,6$ à $1,5 \mu\text{m}$ de long \times $0,5$ à $0,7 \mu\text{m}$ de large), plus clairement définies et leur coloration plus intense. Des lames témoins positifs de *C. burnetii*, *Chlamydophila abortus* et *Brucella* doivent être utilisés pour la comparaison. Le diagnostic réalisé sur la base de la microscopie, couplé avec des résultats sérologiques positifs, est habituellement suffisant (43). Quand la coloration est peu concluante, une des autres méthodes ci-dessous peut être employée comme méthode de confirmation.

b) Méthodes spécifiques de détection

La détection de *C. burnetii* dans les échantillons peut être également réalisée par immuno-détection spécifique (réaction immuno-enzymatique [ELISA], immuno-histochimie), ou par amplification de l'ADN (8, 11, 55). L'immunohistochimie peut être employée sur des tissus inclus dans la paraffine ou sur des frottis fixés à l'acétone (37). Il s'agit d'une analyse immunofluorescente ou immunoenzymatique (peroxydase) indirecte utilisant soit des anticorps polyclonaux dirigés contre *C. burnetii*, soit un antisérum bien caractérisé d'origine humaine ou un antisérum spécifique produit chez des animaux de laboratoire (lapin ou cobaye). Un conjugué anti-IgG anti-espèce (humain, lapin ou cobaye), marqué avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF) ou de la peroxydase, est alors employé pour visualiser les bactéries. Des lames témoins positives d'antigènes de *C. burnetii* doivent être utilisées pour la comparaison. Aucun anticorps spécifique pour l'immunochimie n'est disponible dans le commerce.

Les réactions d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été employées avec succès pour détecter l'ADN de *C. burnetii* dans des cultures de cellules et des échantillons biologiques. Étant donné que le nombre de *C. burnetii* est susceptible d'être plus faible dans le lait, le colostrum, et les fèces que dans les prélèvements provenant de l'avortement, la PCR peut être employée pour l'analyse de ces échantillons. Avant de réaliser la PCR, les échantillons biologiques peuvent être inactivés par la chaleur à 90°C pendant 30 à 60 min selon la nature de l'échantillon, sa taille ou son poids. Cette technique peut être réalisée dans des laboratoires convenablement équipés en utilisant des amorces dérivées de plusieurs cibles, telle que la séquence multi-copie d'insertion (numéro d'accès M80806), qui est la plus employée (4,19). L'utilisation de ces amorces pour l'amplification de cette séquence permet d'augmenter la sensibilité du test en raison de la présence de plusieurs copies dans le génome de *Coxiella*. Le niveau de détection par PCR classique est fonction de l'échantillon à tester (par exemple, 1–500 bactéries/ml de lait ou 1 bactérie/mg de fèces). Les autres gènes cibles décrits pouvant être employés dans la PCR pour l'identification spécifique de *C. burnetii* sont : le gène de la superoxyde dismutase (*sodB*) (numéro d'accès M74242) ; le gène *com1* codant une protéine externe de membrane de 27 kDa (numéro d'accès AB004712) ; et l'opéron de choc thermique codant 2 protéines de choc thermique (*htpA* et *htpB*) (numéro d'accès M20482) ; la citrate déshydrogénase (*icd*) (numéro d'accès AF069035) ; et la protéine potentialisatrice de l'infektivité des macrophages (*cbmip*) (numéro d'accès U14170). Les différentes amorces utilisées dans la PCR peuvent être obtenues sur le site web (http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/Fiches/Fievre_Q.html) mis à jour régulièrement par le Centre National de Recherche Scientifique français.

Le développement récent de la PCR en temps réel fournit des moyens supplémentaires pour la détection et la quantification (21, 22, 52). Comme pour la PCR classique, plusieurs gènes cibles sont utilisés : IS1111 (numéro d'accès M80806) ; *com1* (numéro d'accès AB004712) ; et la citrate déshydrogénase (*icd*). Pour la quantification des bactéries dans des échantillons biologiques avec la PCR en temps réel, il est recommandé d'amplifier une seule séquence spécifique. En effet, des données récentes montrent que le nombre des séquences d'insertion (IS) est très variable (entre 7 et 110) selon les isolats (22). Bien que l'utilisation de cette séquence puisse améliorer la sensibilité du test, elle peut ne pas être assez précise pour la quantification.

Des kits prêts à l'emploi sont disponibles dans le commerce et peuvent détecter les bactéries dans plusieurs échantillons. Cependant, il y a un besoin urgent de développer une méthode moléculaire pour l'évaluation de la viabilité bactérienne, particulièrement dans des échantillons de lait. Le développement d'une épreuve PCR multiplex constitue également une autre technique pour étudier tous les agents abortifs infectieux.

c) Isolement de l'agent pathogène

Pour des recherches spécifiques de laboratoire, il peut être nécessaire d'isoler l'agent. Là où l'examen microscopique a indiqué un grand nombre de *C. burnetii*, combiné avec une faible contamination par d'autres bactéries, l'isolement direct par inoculation d'œufs de poule embryonnés ou la culture de cellules est possible (18). Par exemple, une partie de placenta est homogénéisée en solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) contenant des antibiotiques (streptomycine 100-200 µg/ml et pénicilline ou gentamicine 50-100 µg/ml). Après centrifugation à faible vitesse, des dilutions du surnageant sont inoculées dans des œufs de poule embryonnés de 5 jours au niveau du sac vitellin. Les œufs proviennent de préférence de poules indemnes de pathogènes (SPF). Les embryons qui meurent pendant les 5 premiers jours qui suivent l'inoculation sont jetés. Les sacs vitellins sont récoltés après 10 à 15 jours d'incubation. Des frottis colorés de sac vitellin sont examinés pour s'assurer de l'absence de la contamination bactérienne et pour déterminer la présence de *C. burnetii*. L'analyse par PCR peut être employée pour confirmer la présence de *C. burnetii*. D'autres passages peuvent être requis pour l'obtention d'un isolat pur.

Un système de microculture de cellules provenant d'une méthode commercialisée et employée pour la culture de virus, sur tubes bijoux¹, a été adapté pour isoler les bactéries intracellulaires strictes ou facultatives, y compris *C. burnetii*. Une telle méthode a été décrite pour *C. burnetii* en 1990 (11, 39). Des suspensions d'échantillons sont inoculées sur des fibroblastes embryonnaires de poumon humain (HEL) multipliés sur des lamelles de 1 cm² placées dans un tube bijoux. Une centrifugation de 1 h à 700 *g* augmente l'attachement et la pénétration des bactéries dans les cellules. Trois tubes bijoux sont utilisés pour un même échantillon, et l'effet cytopathogène (ECP) - vacuoles caractéristiques de *C. burnetii* dans les cellules HEL - est examiné à J-3, J-10 et J-21 à l'aide d'un microscope inversé. Après 10 jours, la détection de *C. burnetii* dans les cellules est réalisée directement sur la lamelle à l'intérieur du tube bijoux par une analyse d'immunofluorescence directe avec des anticorps polyclonaux spécifiques de *C. burnetii* et un anticorps anti-espèce approprié conjugué à la ITCF. Les cellules du tube restant sont récoltées et transférées en boîte de culture 25 cm². L'incubation peut être suivie durant 3 mois, en changeant le milieu de culture une fois par semaine. L'infection peut être surveillée par la microscopie sur des cellules cyto-centrifugées provenant de surnageant et colorées par la coloration Gimenez, et par l'analyse PCR des surnageants de culture. Quand les observations d'ECP et la coloration Gimenez ou les résultats PCR sont positifs, un passage en flacon de 75 cm² est réalisé. Le surnageant de culture est ensuite inoculé sur un tapis confluent de cellules VERO ou de fibroblastes de souris L929 en flacon de 150 cm² afin d'établir un isolat de *C. burnetii*. Cette méthode a été développée pour l'homme, mais pourrait être adaptée pour les animaux (50).

Avec des échantillons fortement contaminés, tels que les placentas, écoulements vaginaux, fèces ou lait, l'inoculation d'animaux de laboratoire peut être nécessaire. Pour l'utilisation expérimentale de rongeurs, le niveau de confinement 3 est recommandé (voir le Chapitre 1.1.2.). Les souris et les cobayes sont les animaux de laboratoire les plus appropriés pour cet objectif (45). Après une inoculation intrapéritonéale avec une dose de 0,5 ml par animal, la température corporelle et le statut en anticorps sont surveillés. Cette méthode devrait toujours être réalisée en même temps que les recherches sérologiques sur d'autres cobayes ou souris qui ont été inoculés avec les mêmes échantillons. Les sérums sont collectés 21 jours après l'inoculation. Un résultat positif confirme le diagnostic de l'infection à *C. burnetii*. Si une augmentation de la température est observée, l'animal est tué et la rate est prélevée pour l'isolement de l'agent par inoculation sur œufs de poule embryonnés ou sur cultures cellulaires. L'examen de *C. burnetii* au microscope est réalisé sur les rates à partir de calques colorés. Alternativement, la PCR peut être faite systématiquement sur les rates récoltées 7 à 9 jours post-inoculation (8).

Bien que la caractérisation des isolats semble nécessaire pour la compréhension des variations épidémiologiques de la fièvre Q dans différents secteurs géographiques, aucune méthode de typage discriminatoire n'est disponible actuellement. À cette fin, les efforts doivent se concentrer sur des méthodes de typages génétiques. Les techniques moléculaires de typage à haute résolution qui sont actuellement développées et évaluées pourraient permettre de suivre et de cartographier la progression des souches et de réaliser des études de traçabilité. Des études utilisant le typage multi-spacer (15) et le typage sur le nombre des séquences répétées en tandem (2, 54) ont fait preuve d'un haut niveau de résolution entre les isolats de *C. burnetii*. Des techniques pour typer le génome de *C. burnetii* ont été décrites.

2. Épreuves Sérologiques

Parmi les diverses techniques qui peuvent être utilisées, les 3 épreuves les plus utilisées sont : l'analyse par immunofluorescence indirecte (IFI), l'ELISA et la réaction de fixation du complément (FC) (11). Trois autres méthodes sérologiques plus anciennes ne sont plus employées pour le diagnostic courant : la technique de microagglutination, l'épreuve d'agglutination capillaire et l'épreuve d'hémolyse indirecte. Une épreuve d'agglutination de particules de haute densité (HDPa) a été évaluée (33). Les analyses sérologiques sont appropriées pour le criblage des troupeaux, mais l'interprétation au niveau individuel peut être difficile. En effet, les

¹ Sterilin, Bibby Sterilin Ltd, Stone, Staffordshire ST15 05A, Royaume-Uni

animaux peuvent rester séropositifs pendant plusieurs années à la suite d'une infection aiguë, quelques animaux peuvent excréter la bactérie et engendrer un risque d'infection avant le développement des anticorps, et d'autres animaux infectés semblent ne pas développer d'anticorps (1, 6, 8). Les titres sérologiques seuils employés pour le diagnostic de la fièvre Q sont indiqués plus loin ; l'interprétation des résultats exige au moins l'examen de dix animaux (avortés ou non). Les réponses sérologiques et la mise en évidence de la bactérie sont nécessaires pour établir la présence de l'infection.

a) Épreuve d'immunofluorescence indirecte

En médecine humaine, l'IFI adaptée – technique de micro-immunofluorescence – est la méthode de référence pour le sérodiagnostic de la fièvre Q (11, 57). Le procédé peut être adapté pour réaliser une analyse immuno-enzymatique. Quelques antigènes commerciaux utilisés pour le test de FC peuvent convenir, mais les antigènes préparés pour le diagnostic chez l'homme sont préférables (11). Cette méthode de préparation permet d'obtenir des antigènes donnant la sensibilité la plus élevée pour la détection d'anticorps contre *C. burnetii*. Brièvement, des antigènes de *C. burnetii* de phase I et de phase II sont employés ; l'antigène de phase II est obtenu par multiplication de *C. burnetii* souche Nine Mile en culture cellulaire, alors que l'antigène de phase I est obtenu à partir de rates d'animaux de laboratoire inoculés avec *C. burnetii* en phase II. En effet, quelques bactéries en phase I peuvent toujours être présentes dans la population de phase II et peuvent être sélectionnées et propagées chez les animaux. L'antigène est dilué, déposé sur les puits d'une lame de microscope, celles-ci sont séchées, et fixées avec de l'acétone. Les deux formes de l'infection, aiguë et chronique, ont des profils sérologiques différents : pendant la phase aiguë de la maladie, des titres d'anticorps de type IgG sont élevés contre la phase II, tandis que pendant la phase chronique de la maladie, des niveaux élevés d'anticorps de type IgG anti-phase I et phase II sont observés (57). Des lames contenant des puits chargés d'antigènes sont disponibles dans le commerce, fournissant un antigène de phase II, ou à la fois les antigènes de la phase I et II de *C. burnetii*. Ceux-ci peuvent être adaptés en remplaçant le conjugué humain par un conjugué adapté aux espèces animales.

Des dilutions de 2 en 2 du sérum à éprouver sont déposées sur les puits des lames précédemment chargés avec un ou deux antigènes. Si les anticorps spécifiques sont présents, ils se fixent sur l'antigène de la lame. Le complexe est alors détecté par l'observation avec un microscope à fluorescence après l'addition du conjugué fluorescent reconnaissant les immunoglobulines de l'espèce animale adéquate.

- **Préparation de l'antigène**

L'antigène doit être préparé exclusivement dans des locaux qui répondent aux exigences de manipulation des agents pathogènes du groupe 3 conformément au Chapitre 1.1.2. de ce *Manuel terrestre*.

C. burnetii souche Nine Mile de phase II est multipliée sur un tapis confluent de cellules VERO ou de cellules L929 en flacons de 150 cm² en présence de milieu essentiel minimum (MEM) complété avec 2 mM de L-glutamine et de 4 % de sérum de veau fœtal. L'évolution de l'infection est suivie par un examen au microscope des cellules colorées par la coloration de Gimenez après grattage du tapis cellulaire. Quand l'infection des cellules par *C. burnetii* semble importante, les surnageants de culture de 15 flacons sont individuellement centrifugés (5 000 g, pendant 15 min) et les culots resuspendus avec 1 ml de PBS contenant 0,1 % de formaldéhyde et incubés pendant 24 h à 4 °C. Après avoir été rassemblées, les cellules restantes sont éclatées par sonication. Les débris cellulaires sont éliminés par deux étapes successives de centrifugation (100 g, 10 min chacune). La suspension de 15 ml est alors centrifugée sur un coussin de sucrose composé de 20 ml de PBS avec 25 % de sucrose (6 000 g, 30 min, sans arrêt). Le culot obtenu est lavé 3 fois en PBS (6 000 g, 10 min), resuspendu dans un volume d'eau distillée stérile le plus faible possible, et ajusté à 2 mg/ml après une lecture en spectrométrie UV. De l'azide de sodium à une concentration finale de 0,1 % ou du thiomersal à 0,01 % sont ajoutés comme antibactériens. L'antigène préparé de cette manière est congelé à –20 °C.

Afin d'obtenir l'antigène de phase I, des souris sont inoculées avec *C. burnetii* souche Nine Mile multipliée sur cellules (principalement en phase II). Neuf jours après infection, les rates des animaux sont prélevées. Chacune d'elle est écrasée avec 7,5 ml de MEM, et inoculé dans 3 flacons de culture de 75 cm² contenant un tapis cellulaire de L929 ou de VERO (soit 2,5 ml par flacon). L'amplification de *C. burnetii* de la phase I est conduite pendant 4 semaines, avec un changement de milieu de culture une fois par semaine. Les cellules infectées sont alors récoltées et les bactéries (principalement en phase I) sont purifiées comme décrit ci-dessus.

La production d'antigène peut également être réalisée par culture de *C. burnetii* sur des œufs embryonnés SPF. Le micro-organisme est inoculé dans le sac vitellin d'œufs embryonnés âgés de 5 à 6 jours, ces derniers sont récoltés après la mort de l'embryon à 12-15 jours. Les sacs vitellins infectés ont une couleur jaune paille caractéristique. Les sacs vitellins non infectés sont orangés et ont une consistance visqueuse. Tous les embryons qui meurent entre 5 et 10 jours d'incubation sont jetés. La suspension utilisée pour l'inoculation des œufs est un homogénat de sac vitellin dilué au 1/100 en PBS contenant de la pénicilline (500 UI/ml) et de la

streptomycine (0,5 mg/ml). Les sacs vitellins sont réunis et homogénéisés avec 3 volumes de PBS. La suspension est inactivée avec du formaldéhyde 1,6 % pendant 24 h à 37 °C. Le surnageant lipidique est jeté. La suspension est alors centrifugée à vitesse moyenne (~500 g) pendant 30 min. Après avoir enlevé le surnageant, un volume plus important de PBS est ajouté et la suspension est centrifugée à nouveau. La suspension finale est diluée avec du PBS. De l'azide de sodium ou du thiomersal sont ajoutés comme antibactériens. La quantité de *C. burnetii* et l'absence de contaminants bactériens dans les homogénats de sacs vitellins repris en PBS sont vérifiées par examen au microscope d'un frottis réalisé sur une lame et coloré par la méthode de Stamp. Afin d'obtenir un antigène de phase I, *C. burnetii* récupérée à partir de rates d'animaux de laboratoire infectés peut être multipliée ensuite sur œufs, donnant ainsi un taux de bactéries en phase I encore élevé jusqu'au 6^e passage.

Le titrage de l'antigène avec au moins 3 sérums connus différents (avec des titres élevé, moyen et bas, respectivement) est suffisant pour déterminer la dilution appropriée à utiliser dans les autres épreuves d'immunofluorescence.

- **Matériel et réactifs**

Microscope équipé pour la fluorescence, incubateur humidifié, bac de lavage.

Des lames appropriées pour le dépôt d'antigène sont nécessaires. Ce dernier peut être préparé au laboratoire ou être acheté chez un fournisseur (voir ci-dessus). La méthode décrite est adaptée du kit de diagnostic de BioMérieux, et est donnée comme exemple. Les lames prêtes à emploi contiennent 12 puits par lame, chacun ayant un diamètre de 7 mm, l'antigène de la phase II obtenu à partir de la culture sur des cellules VERO y a été déposé. Les lames peuvent être stockées à 4 °C ou à -20 °C.

Conjugué fluorescent concentré, à diluer en PBS + 1 % de bleu Evans à la dilution recommandée par le fabricant.

PBS, glycérine tamponnée, solution à 1 % de bleu Evans.

- **Protocole**

- i) Inactiver le sérum 30 min à 56 °C avant de réaliser l'épreuve, puis le diluer en série de 1/40 à 1/640 en PBS.
- ii) Sortir les lames et les mettre à température ambiante. Ne pas toucher les puits.
- iii) Ajouter 20 µl de chaque dilution de sérum sur les puits. Ajouter un sérum témoin positif et négatif. Sur un des puits, ajouter uniquement 20 µl de PBS qui servira de témoin antigène.
- iv) Incuber dans une chambre humide pendant 30 min à 37 °C. Laver les lames 2 fois avec du PBS pendant 10 min pour chaque lavage. Rincer avec de l'eau distillée puis sécher à l'air.
- v) Ajouter aux puits, y compris les témoins, 20 µl du conjugué dirigé contre l'espèce appropriée (par exemple un anticorps de lapin anti-IgG [H+L] chèvre ou anti-IgG [H+L] mouton marqué ITCF), dilué extemporanément dans PBS + Bleu Evans. Incuber dans une chambre humide pendant 30 min à 37 °C. Rincer avec de l'eau distillée et sécher à l'air. Ajouter quelques gouttes de glycérine et couvrir avec une lamelle. Examiner sous un microscope à fluorescence à l'objectif × 400 ou plus.

- **Interprétation des résultats**

L'observation de petits points brillants sur un fond foncé signera une réaction positive. Vérifier que le conjugué par lui-même et que le sérum témoin négatif donnent un résultat négatif (absence de petits points brillants). La fluorescence non spécifique prend habituellement la forme de taches irrégulières. Le témoin positif doit donner le titre attendu avec ± un facteur de dilution.

La réaction est considérée comme positive s'il y a une immunofluorescence spécifique à la dilution 1/160 et plus. En médecine humaine, cette méthode est employée pour déterminer les anticorps contre les phases I et II d'isotypes IgG, d'IgM, et d'IgA permettant de différencier les formes aiguë et chronique de la fièvre Q. Le facteur rhumatoïde est employé pour éliminer les IgG avant la détermination des IgM et IgA. Une première sélection des sérums est effectuée avec l'antigène de la phase II, et les sérums donnant un résultat positif sont réexaminés pour détecter la présence des différentes classes d'Ig dirigées contre les antigènes de phases I et II. Cependant, les réponses anticorps contre les phases I et II, ainsi que les réponses des différentes classes d'Ig n'ont pas été bien étudiées chez les animaux domestiques.

b) Test de fixation du complément

Cette microméthode de fixation à froid développée par Kolmer est réalisée sur des plaques de microtitrage de 96 puits à fond rond. Le test détecte les anticorps fixant le complément dans le sérum. La méthode de fixation du complément (FC) est spécifique mais moins sensible que l'ELISA ou l'IFI (11, 34). La séroconversion est détectée plus tardivement par rapport à l'IFI ou l'ELISA, mais les anticorps FC peuvent persister pendant de longues périodes après maladie ; le test de FC donne d'excellents résultats pour le diagnostic de routine des maladies abortives dans les élevages (41, 43). Le test de FC est encore fréquemment employé par beaucoup de laboratoires dans un grand nombre de pays. Cette méthode emploie souvent l'antigène de phase II préparé à partir d'un mélange de deux souches (Nine Mile et Henzerling)² ou un mélange des phases I et II préparés à partir de la souche Nine Mile³. En France, cette méthode a été normalisée (AFNOR NFU47-006).

La réaction est réalisée en deux étapes. L'antigène et les anticorps fixant le complément sont d'abord mélangés, puis des érythrocytes de moutons, sensibilisés par un sérum anti-érythrocytes de moutons, sont ajoutés. La fixation du complément par le complexe d'antigène/anticorps pendant la première étape ne permet pas la lyse des érythrocytes ; en revanche, s'il n'y a aucun anticorps pour la fixation du complément, le complément induit la lyse des érythrocytes sensibilisés. De ce fait, le taux d'hémolyse est inversement proportionnel à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans le sérum à tester.

- **Réactifs**

Tampon véronal/calcium/magnésium (TV), pH 7,2.

Système hémolytique : mélange à parties égales d'une suspension de 2 % des érythrocytes de moutons en TV et de sérum hémolytique dilué à un titre indiqué en TV.

Complément : préparation commerciale lyophilisée ou sérum frais de cobaye.

Antigène : employer les antigènes commerciaux au titre recommandé par le fabricant si le titrage de l'antigène est réalisé avec cette méthode.

Sérums témoins positifs et négatifs.

- **Pré-titrages**

- Diluer les érythrocytes de moutons à une concentration finale de 2 % dans le TV.
- Titre le sérum hémolytique sur une microplaque : 25 µl de complément à une concentration hémolytique connue (par exemple 1/30) ; 25 µl des dilutions croissantes de sérum hémolytique + 2 % érythrocytes de moutons. Inclure les témoins sans complément. Incubez 30 min à 37 °C. Déterminer la dilution équivalente à 2 unités hémolytiques.
- Diluer l'antigène comme recommandé par le fabricant. L'antigène peut également être titré : faire des dilutions croissantes d'antigène (25 µl horizontalement) et d'un sérum positif de titre connu (25 µl verticalement). Ajouter 25 µl de la suspension d'érythrocytes sensibilisés et incubé pendant 30 min à 37 °C. Le titre en antigène est la dilution la plus élevée qui donne une réaction positive à la dilution la plus élevée du sérum. Vérifier l'absence d'une activité anti-complément de l'antigène aux différentes dilutions.
- Titre le complément sur une microplaque : diluer en série le complément ou le sérum de cobaye en TV, par exemple de 1/15 à 1/200. À chacun des puits contenant 25 µl de cette dilution, ajouter 25 µl d'antigène et 25 µl du système hémolytique. Incuber pendant 30 min à 37 °C et déterminer la dilution équivalente à 2 unités hémolytiques de complément.

- **Protocole**

- Faire les dilutions des sérums décomplémentés à tester de 2 en 2, du 1/10 au 1/320, dans 6 puits et dans 4 autres puits additionnels aux dilutions de 1/10 à 1/80 pour détecter l'activité anti-complément (25 µl par puits).
- Ajouter 25 µl d'antigène dilué ou 25 µl de VB pour les puits sérum témoin.
- Ajouter 25 µl de complément dilué dans tous les puits. Couvrir la plaque d'un film plastique adhésif et incubé pendant 18 h à 4 °C.

² Dade Behring, Marburg, Allemagne.

³ Virion, Zürich, Suisse

- iv) Enlever les plaques du réfrigérateur, attendre qu'elles reviennent à la température ambiante, et ajouter 25 µl de système hémolytique fraîchement préparé. Incuber à 37 °C pendant 30 min. Centrifuger les plaques à 500 g pendant 5 min à 4 °C. Examiner les témoins et lire les résultats.

- **Interprétation des résultats**

Des titres entre 1/10 et 1/40 sont caractéristiques d'une infection latente. Des titres de 1/80 ou au delà dans un ou plusieurs sérums provenant d'un groupe de 5 à 10 animaux révèlent une phase évolutive de l'infection.

c) Épreuve immuno-enzymatique

Cette technique a une sensibilité élevée et une bonne spécificité (11, 40, 59). Elle est facilement réalisable dans les laboratoires qui ont l'équipement nécessaire (un spectrophotomètre) et les réactifs. L'ELISA tend à remplacer l'épreuve d'IFI et le test de FC en tant que méthode de choix parce qu'il convient pour le criblage à grande échelle, en particulier pour le diagnostic vétérinaire. C'est une technique fiable pour démontrer la présence d'anticorps dirigés contre *C. burnetii* dans diverses espèces animales (20, 49). Il exige un antigène relativement pur. Les antigènes préparés pour le test de FC peuvent être employés pour sensibiliser les plaques. Des kits de diagnostic ELISA capables de distinguer l'anti-phase I et II des anticorps sont en cours de développement.

Les puits d'une microplaque sont sensibilisés avec un antigène total de *C. burnetii* obtenu par culture cellulaire et inactivé. Des dilutions de sérum sont ajoutées aux puits et réagissent avec les antigènes liés au support. Après une période d'incubation appropriée, les différents composants du sérum non fixés sont éliminés par lavage. Le conjugué (anti-Ig de ruminant marqué à la peroxydase) réagit avec les anticorps spécifiques qui se sont liés à l'antigène. Le conjugué non fixé est ensuite éliminé par lavage après une période d'incubation. Le substrat de l'enzyme est ajouté. La quantité de substrat utilisé est proportionnelle à la quantité d'anticorps fixés. La réaction est arrêtée après un temps approprié et l'intensité de la coloration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

- **Matériels et réactifs**

Plaques de microtitrage de 96 puits à fond plat, fraîchement ou préalablement sensibilisés avec de l'antigène de fièvre Q ; lecteur de microplaques (spectrophotomètre ; filtres de 405 et/ou 450 et/ou 492 nm) ; incubateur humide à 37 °C ; pipettes multicanaux (8 et 12) avec embouts en plastique jetables ; agitateur de microplaques (facultatif).

Sérums témoins positifs et négatifs ; conjugué (anti-immunoglobuline de ruminant marqué avec de la peroxydase) ; tampon à une concentration de facteur 10 (PBS-Tween) ; eau distillée ; substrat ou chromogène (TMB, [tetraméthylbenzidine]), ABTS [acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] pour la peroxydase ; eau oxygénée.

- **Protocole**

- i) Diluer les échantillons de sérum, y compris des sérums témoins, à la dilution appropriée (habituellement 1/100) et distribuer en double 0,1 ml par puits. Les sérums témoins sont des sérums positifs et négatifs fournis par le fabricant et un sérum positif interne de référence du laboratoire afin de comparer les titres entre différents essais.
- ii) Couvrir la plaque d'un couvercle et incuber à température ambiante pendant 30 à 90 min. Vider les puits et laver 3 fois dans le tampon de lavage à température ambiante.
- iii) Ajouter le conjugué à la dilution appropriée et fraîchement préparé (0,1 ml par puits).
- iv) Couvrir chaque plaque et incuber comme dans l'étape ii). Laver à nouveau 3 fois.
- v) Ajouter 0,1 ml de solution fraîchement préparée de substrat de chromogène dans chacun des puits (par exemple : TMB dans 0,1 M d'acide acétique et solution 30 % d'H₂O₂ [0,2 µl/ml] ; ou 0,25 mM ABTS en tampon phosphate citraté, pH 5,0, et solution 30 % d'H₂O₂ [0,1 µl/ml]).
- vi) Agiter la plaque ; incuber selon les instructions du fournisseur, arrêter la réaction en ajoutant la solution d'arrêt à chaque puits, par exemple 0,05 ml d'une solution d'acide sulfurique 2 M pour le TMB ou une solution de SDS à 10 % pour l'ABTS.
- vii) Lire l'absorbance de chaque puits avec le lecteur de microplaque à 405 nm (ABTS) ou à 450 nm (TMB). Les valeurs d'absorbance seront employées pour calculer les résultats.

- **Interprétation des résultats**

Pour les kits de diagnostic commerciaux, les interprétations et les valeurs sont fournies avec ces kits.

Par exemple : calculer l'absorbance moyenne (Ab) du sérum à tester, celle du sérum témoin positif (Ab_{pos}) et celle du sérum témoin négatif (Ab_{neg}), et pour chaque sérum, calculer le pourcentage :

$$\frac{Ab - Ab_{neg}}{Ab_{pos} - Ab_{neg}} \times 100$$

Interprétez les résultats comme suit :

Ab < 30 % sérum négatif
 Ab 30–40 % sérum douteux
 Ab > 40 % sérum positif

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

1. Vaccins

La vaccination est la stratégie la plus logique pour empêcher la contamination des individus et du bétail exposés à la fièvre Q. Un vaccin vis-à-vis de *C. burnetii* doit être préparé par du personnel qualifié travaillant dans des conditions de protection appropriées (au minimum dans un laboratoire de biosécurité de niveau 3). Il est recommandé d'apporter la plus grande attention aux certificats validant les tests d'innocuité, d'inactivation et de stérilité du vaccin.

Les lignes directrices pour la production des vaccins vétérinaires sont données au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ici et au Chapitre 1.1.8. sont prévues pour être de type général et peuvent être complétées par des recommandations nationales et régionales.

Dans certains pays, la vaccination est pratiquée chez les personnes professionnellement exposées, telles que les ouvriers d'abattoir, les vétérinaires et le personnel de laboratoire. Un vaccin inactivé par le formaldéhyde (Q-VAX, CSL Ltd, Australie), préparé à partir de la souche Henzlering phase I de *C. burnetii*, a reçu l'approbation des autorités australiennes en 1989 (28). Les vaccins de la phase I sont plus efficaces, mais la vaccination est contre-indiquée pour les individus qui possèdent déjà une réponse humorale ou qui ont déjà été exposés à *C. burnetii* avant l'immunisation.

Plusieurs vaccins ont été développés contre la fièvre Q animale. Les résultats convergent aujourd'hui vers l'utilisation d'un vaccin de phase I, car les vaccins de la phase II sont 100 fois moins efficaces au niveau de la colonisation de la rate des souris que les vaccins de phase I (13). Un vaccin inactivé de la phase I est disponible en Slovaquie pour vacciner le bétail. Une étude en Slovaquie suggère que la régression des cas de fièvre Q humaine et animale pourrait être le résultat de la vaccination à grande échelle du bétail effectuée durant 10 ans, et de l'amélioration du contrôle vétérinaire dans le transport des animaux domestiques dans le pays (46).

Ce vaccin se compose d'antigène hautement purifié préparé à partir de la souche de Nine Mile en phase I (de 2 à 6 passages sur œuf) et inactivé par le formol. Récemment, une étude française a démontré l'efficacité de ce vaccin lors d'une vaccination suivie d'une épreuve expérimentale chez des chèvres gestantes : le vaccin a empêché l'apparition des avortements et l'excrétion des bactéries dans le lait, mais a aussi diminué considérablement l'excrétion dans les sécrétions vaginales et les fèces (3). Idéalement, l'efficacité vaccinale devrait être également démontrée par des essais sur toutes les espèces cibles.

Dans le cas de la vaccination d'animaux déjà infectés, aucune information n'est pour le moment disponible sur les éventuels effets indésirables et sur l'excrétion de l'agent de la fièvre Q. En conséquence, quelques auteurs pensent qu'il est préférable de choisir des troupeaux ou des animaux séronégatifs avant l'immunisation, et de continuer la vaccination sur plusieurs années chez les jeunes animaux (24). Jusqu'ici, aucune donnée n'est disponible pour comparer le coût-bénéfice de cette stratégie par rapport à une stratégie non sélective dans le contrôle de la fièvre Q.

2. Produits biologiques pour le diagnostic

Voir Section B.2.a (Préparation de l'antigène).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ADESIYUN A.A., JAGUN A.G., KWAGA J.K. & TEKDEK L.B. (1985). Shedding of *Coxiella burnetii* in milk by Nigerian dairy and dual purposes cows. *Int. J. Zoonoses*, **12**, 1–5.
2. ARRICAU-BOUVER Y., HAUCK Y., BEJAOU A., FRANGOULIDIS D., BODIER C., SOURIAU A., MEYER H., NEUBAUER H., RODOLAKIS A. & VERGNAUD G. (2006). Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol.*, **6**, 38.
3. ARRICAU-BOUVER Y., SOURIAU A., BODIER C., DUFOUR P., ROUSSET E. & RODOLAKIS A. (2005). Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine*, **23**, 4392–4402.
4. BERRI M., LAROUCAU K. & RODOLAKIS A. (2000). The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, **72**, 285–293.
5. BERRI M., ROUSSET E., HÉCHARD C., CHAMPION J.L., DUFOUR P. & RODOLAKIS A. (2005). Progression of Q fever and *Coxiella burnetii* shedding in milk after an outbreak of enzootic abortion in a goat herd. *Vet. Rec.*, **150**, 548–549.
6. BERRI M., SOURIAU A., CROSBY M., CROCHET D., LECHOPIER P. & RODOLAKIS A. (2001). Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Vet. Rec.* **148**, 502–505.
7. BERRI M., SOURIAU A., CROSBY M. & RODOLAKIS A. (2002). Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. *Vet. Microbiol.*, **85**, 55–60.
8. BOUVER Y., SOURIAU A., LECHOPIER P. & RODOLAKIS A. (2003). Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet. Res.*, **34**, 423–433.
9. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2000). Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. Recommendations of the CDC Strategic Planning Workgroup. *MMWR Recomm. Rep.*, **49**, 1–14.
10. COLEMAN S.A., FISCHER E.R., HOWE D., MEAD D.J. & HEINZEN R.A. (2004). Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. *J. Bacteriol.*, **186**, 7344–7352.
11. FOURNIER P.E., MARRIE T.J. & RAOULT D. (1998). Diagnosis of Q fever. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 1823–1834.
12. FOURNIER P.E. & RAOULT D. (2003). Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5094–5098.
13. GAJDOSOVA E., KOVACOVA E., TOMAN R., SKULTETY L., LUKACOVA M. & KAZAR J. (1994). Immunogenicity of *Coxiella burnetii* whole cells and their outer membrane components. *Acta Virol.*, **38**, 339–344.
14. GIMENEZ D.F. (1964). Staining rickettsiae in yolk-sack cultures. *Stain. Technol.*, **39**, 135–140.
15. GLAZUNOVA O., ROUX V., FREYLIKMAN O., SEKEYOVA Z., FOURNOUS G., TYCZKA J., TOKAREVICH N., KOVACOVA E., MARRIE T. & RAOULT D. (2005). *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1211–1217.
16. HATCHETTE T.F., HUDSON R.C., SCHLECH W.F., CAMPBELL N.A., HATCHETTE J.E., RATNAM S., RAOULT D., DONOVAN C. & MARRIE T.J. (2001). Goat-associated Q fever: a new disease in Newfoundland. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 413–419.
17. HEINZEN R.A., HACKSTADT T. & SAMUEL J.E. (1999). Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.*, **7**, 149–154.
18. HO T., HTWE K.K., YAMASAKI N., ZHANG G.Q., OGAWA M., YAMAGUCHI T., FUKUSHI H. & HIRAI K. (1995). Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan. *Microbiol. Immunol.*, **39**, 663–671.

19. HOOVER T.A., VODKIN M.H. & WILLIAMS J.C. (1992). A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J. Bacteriol.*, **174**, 5540–5548.
20. JASPERS U., THIELE D. & KRAUSS H. (1994). Monoclonal antibody based competitive ELISA for the detection of specific antibodies against *Coxiella burnetii* in sera from different animal species. *Zentralbl. Bakteriol.*, **281**, 61–66.
21. KIM S.G., KIM E.H., LAFFERTY C.J. & DUBOVI E. (2005). *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 619–621.
22. KLEE S.R., TYCZKA J., ELLERBROK H., FRANZ T., LINKE S., BALJER G. & APPEL B. (2006). Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol.*, **6**, 2.
23. KOSATSKY T. (1984). Household outbreak of Q-fever pneumonia related to a parturient cat. *Lancet*, **2**, 1447–1449.
24. KRAUSS H. (1989). Clinical aspects and prevention of Q fever in animals. *Eur. J. Epidemiol.*, **5**, 454–455.
25. KRUSZEWSKA D. & TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA S. (1997). Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Res. Vet. Sci.*, **62**, 299–300.
26. LABRENZ M. & HIRSCH P. (2003). The genus *Coxiella*. In: *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*, Garrity G., Boone D.R. & Castenholz R.W., eds. Springer-Verlag, New York, USA.
27. LANG G.H. (1990). Coxiellosis (Q fever) in animals. In: *Q Fever. Volume I: The Disease*, Marrie T.J., ed. CRC Press, Boca Raton, USA, 23–48.
28. MARMION B.P., ORMSBEE R.A., KYRKOV N.V., WRIGHT J., WORSWICK D.A., IZZO A.A., ESTERMAN A., FEERY B. & SHAPIRO R.A. (1990). Vaccine prophylaxis of abattoir-associated Q fever: eight years' experience in Australian abattoirs. *Epidemiol. Infect.*, **104**, 275–287.
29. MARRIE T.J. (1990). Epidemiology of Q fever. In: *Q Fever. Volume I: The Disease*, Marrie T.J., ed. CRC Press, Boca Raton, USA, 49–70.
30. MAURIN M. & RAOULT D. (1999). Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 518–553.
31. MCCAUL T.F. & WILLIAMS J.C. (1981). Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J. Bacteriol.*, **147**, 1063–1076.
32. MILAZZO A., HALL R., STORM P.A., HARRIS R.J., WINSLOW W. & MARMION B.P. (2001). Sexually transmitted Q fever. *Clin. Infect. Dis.*, **33**, 399–402.
33. NGUYEN S.V., TO H., MINAMOTO N., OGAWA M., YAMAGUCHI T., FUKUSHI H. & HIRAI K. (1997). Evaluation of the high-density agglutination test for *Coxiella burnetii* antibodies in animals. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **4**, 676–680.
34. PETER O., DUPUIS G., PEACOCK M.G. & BURGDORFER W. (1987). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation and indirect fluorescent-antibody tests for detection of *Coxiella burnetii* antibody. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 1063–1067.
35. QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B. & CARTER G.R. (1994). Bacterial pathogens: microscopy, culture and identification. In: *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, Mosby-Year Book Europe Limited, 21–30.
36. RAOULT D., FENOLLAR F. & STEIN A. (2002). Q fever during pregnancy: diagnosis, treatment, and follow-up. *Arch. Intern. Med.*, **162**, 701–704.
37. RAOULT D., LAURENT J.C. & MUTILLOD M. (1994). Monoclonal antibodies to *Coxiella burnetii* for antigenic detection in cell cultures and in paraffin-embedded tissues. *Am. J. Clin. Pathol.*, **101**, 318–320.
38. RAOULT D., TISSOT-DUPONT H., FOUCAULT C., GOUVERNET J., FOURNIER P.E., BERNIT E., STEIN A., NESRI M., HARLE J.R. & WEILLER P.J. (2000). Q fever 1985–1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. *Medicine (Baltimore)*, **79**, 109–123.

39. RAOULT D., VESTRIS G. & ENEA M. (1990). Isolation of 16 strains of *Coxiella burnetii* from patients by using a sensitive centrifugation cell culture system and establishment of the strains in HEL cells. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2482–2484.
40. ROGES G. & EDLINGER E. (1986). Immunoenzymatic test for Q-fever. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **4**, 125–132.
41. RUSSO P. (1997). Infection à *Coxiella burnetii* ou Fièvre Q. In: Manuel pratique de diagnostic de laboratoire des avortements infectieux des petits ruminants, Rodolakis A. & Nettleton P., eds. L'Espace Vétérinaire, Casablanca, Morocco, 103–114.
42. SANCHIS R. (1982). Diagnostic direct des avortements infectieux des petits ruminants. *Rev. Méd. Vét.*, **133**, 351–356.
43. SANCHIS R., RUSSO P., CALAMEL M. & PEPIN M. (1997). Diagnostic différentiel des avortements infectieux des petits ruminants. In: Manuel pratique de diagnostic de laboratoire des avortements infectieux des petits ruminants, Rodolakis A. & Nettleton P., eds. L'Espace Vétérinaire, Casablanca, Morocco, 25–34.
44. SANFORD S.E., JOSEPHSON G.K. & MACDONALD A. (1994). *Coxiella burnetii* (Q fever) abortion storms in goat herds after attendance at an annual fair. *Can. Vet. J.*, **35**, 376–378.
45. SCOTT G.H., WILLIAMS J.C. & STEPHENSON E.H. (1987). Animal models in Q fever: pathological responses of inbred mice to phase I *Coxiella burnetii*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 691–700.
46. SERBEZOV V.S., KAZAR J., NOVKIRISHKI V., GATCHEVA N., KOVACOVA E. & VOYNOVA V. (1999). Q fever in Bulgaria and Slovakia. *Emerg. Infect. Dis.*, **5**, 388–394.
47. SESHADRI R., PAULSEN I.T., EISEN J.A., READ T.D., NELSON K.E., NELSON W.C., WARD N.L., TETTELIN H., DAVIDSEN T.M., BEANAN M.J., DEBOY R.T., DAUGHERTY S.C., BRINKAC L.M., MADUPU R., DODSON R.J., KHOURI H.M., LEE K.H., CARTY H.A., SCANLAN D., HEINZEN R.A., THOMPSON H.A., SAMUEL J.E., FRASER C.M. & HEIDELBERG J.F. (2003). Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 5455–5460.
48. SESHADRI R. & SAMUEL J.E. (2001). Characterization of a stress-induced alternate Sigma factor, RpoS, of *Coxiella burnetii* and its expression during the development cycle. *Infect. Immun.*, **69**, 4874–4883.
49. SOLIMAN A.K., BOTROS B.A. & WATTS D.M. (1992). Evaluation of a competitive immunoassay for detection of *Coxiella burnetii* antibody in animal sera. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1595–1597.
50. SPYRIDAKI I., PSAROULAKI A., LOUKAIDES F., ANTONIOU M., HADJICHRISTODOLOU C. & TSELENTIS Y. (2002). Isolation of *Coxiella burnetii* by a centrifugation shell-vial assay from ticks collected in Cyprus: detection by nested polymerase chain reaction (PCR) and by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **66**, 86–90.
51. STEIN A. & RAOULT D. (1999). Pigeon pneumonia in provence: a bird-borne Q fever outbreak. *Clin. Infect. Dis.*, **29**, 617–620.
52. STEMMLER M. & MEYER H. (2002). Rapid and specific detection of *Coxiella burnetii* by LightCycler PCR. In: Methods and Applications. Microbiology and Food Analysis, Reisch U., Wittwer C. & Cockerill F., eds. Springer, Berlin, Germany 149–154.
53. SUNG N. & COLLINS M.T. (1998). Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 999–1005.
54. SVRAKA S., TOMAN R., SKULTETY L., SLABA K. & HOMAN W.L. (2006) Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **254**, 268–274.
55. THIELE D., KARO M. & KRAUSS H. (1992). Monoclonal antibody based capture ELISA/ELIFA for detection of *Coxiella burnetii* in clinical specimens. *Eur. J. Epidemiol.*, **8**, 568–574.
56. THOMPSON H.A., HOOVER T.A., VODKIN M.H. & SHAW E.I. (2003). Do chromosomal deletions in the lipopolysaccharide biosynthetic regions explain all cases of phase variation in *Coxiella burnetii* strains? An update. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **990**, 664–670.

57. TISSOT-DUPONT H., THIRION X. & RAOULT D. (1994). Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **1**, 189–196.
58. VAN MOLL P., BAUMGARTNER W., ESKENS U. & HANICHEN T. (1993). Immunocytochemical demonstration of *Coxiella burnetii* antigen in the fetal placenta of naturally infected sheep and cattle. *J. Comp. Pathol.*, **109**, 295–301.
59. WAAG D., CHULAY J., MARRIE T., ENGLAND M. & WILLIAMS J. (1995). Validation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of acute Q fever. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **14**, 421–427.
60. WEISBURG W.G., DOBSON M.E., SAMUEL J.E., DASCH G.A., MALLAVIA L.P., BACA O., MANDELCO L., SECHREST J.E., WEISS E. & WOESE C.R. (1989). Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J. Bacteriol.*, **171**, 4202–4206.

*
* *

RAGE

RÉSUMÉ

La rage est une zoonose majeure pour laquelle les techniques sont normalisées au niveau international. Comme il n'y a pas de lésions macroscopiques qui soient pathognomoniques de la rage, le diagnostic ne peut être porté qu'au laboratoire. Les techniques de diagnostic de laboratoire sont de préférence appliquées au système nerveux central (SNC) extrait de la boîte crânienne. L'analyse doit porter sur plusieurs échantillons du SNC et de la moelle épinière.

Identification de l'agent pathogène : l'identification de l'agent pathogène est faite de préférence au moyen de la technique d'immunofluorescence (IF). Une goutte d'immunoglobuline purifiée préalablement conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine est déposée sur un calque (ou un étalement) de tissu cérébral fixé à l'acétone. Des calques sont réalisés de préférence à partir de plusieurs parties de l'encéphale. L'IF permet un diagnostic fiable dans 98 à 100 % des cas, quelque soit le sérotype du virus en cause, à condition d'employer un conjugué sensible. Pour tester un grand nombre d'échantillons, par exemple lors d'enquêtes épidémiologiques, l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ou une technique immuno-enzymatique peut fournir des résultats rapides.

Des cellules nerveuses infectées ont été mises en évidence au moyen d'épreuves histologiques qui révèlent des agrégats de matériel viral (les corps de Negri) dans le cytoplasme des neurones. Cependant, la sensibilité des techniques histologiques est bien inférieure à celle des méthodes immunologiques, surtout si l'autolyse de l'échantillon a commencé. Par conséquent, les techniques histologiques ne peuvent plus être recommandées.

Comme une seule épreuve négative sur matériel frais n'élimine pas toute possibilité d'infection, des épreuves d'inoculation sur souris ou en cultures cellulaires doivent être réalisées simultanément. Un tapis de cellules sensibles est inoculé avec un mélange de différents tissus du SNC (dont la moelle épinière). Un examen en IF réalisé après un temps d'incubation approprié démontrera la présence ou l'absence de l'antigène viral. Des souriceaux âgés de 3 à 4 semaines peuvent aussi être inoculés par voie cérébrale avec ce même mélange de tissus, et gardés en observation 28 jours. Pour toute souris mourant entre le 5^e et le 28^e jour après inoculation, la cause de la mort doit être confirmée par un examen en IF. Chaque fois que cela est possible, l'isolement du virus sur cellules doit remplacer l'épreuve d'inoculation à la souris.

L'identification de l'agent pathogène peut être effectuée dans des laboratoires spécialisés en identifiant des variants au moyen d'anticorps monoclonaux, de sondes nucléiques spécifiques ou par PCR suivie d'un séquençage de l'ADN des régions génomiques considérées. Ces techniques permettent de différencier les souches vaccinales des souches sauvages, elles permettent aussi d'identifier l'origine géographique des souches de terrain. Ces épreuves très sensibles ne devraient être utilisées que par un personnel bien formé dans des laboratoires spécialisés.

Épreuves sérologiques : l'épreuve prescrite pour les échanges internationaux est l'épreuve de séroneutralisation virale (SN) sur culture cellulaire. On peut également utiliser une épreuve dont les résultats soient corrélés avec ces épreuves prescrites, en particulier la méthode immuno-enzymatique (ELISA) utilisant les anticorps dirigés contre la protéine G ou l'épreuve de neutralisation sur souris. Les résultats sont exprimés en Unités Internationales (UI) ou en unités équivalentes par rapport à un antisérum étalon international.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : les vaccins antirabiques à usage vétérinaire contiennent soit un virus vivant atténué pour l'espèce cible (comme les souches Flury LEP ou HEP, Street-Alabama-Dufferin ou Kelev) soit un virus

inactivé par des moyens chimiques ou physiques ou bien encore un vaccin recombinant. Le virus est cultivé sur œufs embryonnés ou sur cultures cellulaires.

Les vaccins antirabiques sont d'habitude lyophilisés mais des vaccins à virus inactivés, en général adjuvés, peuvent être conservés sous forme liquide.

Avant que des vaccins nouvellement développés ne soient agréés, la durée de l'immunité qu'ils confèrent doit être déterminée sur des animaux de l'espèce cible. Ils doivent protéger contre la rage pendant au moins un an.

Pour des vaccins à virus vivants, la dose virale minimale qui induit la réponse immune recherchée doit être établie.

L'activité des vaccins à virus inactivés est établie et contrôlée sur souris avec une vaccination suivie d'une épreuve intracérébrale selon les tests de l'United States Department of Agriculture ou de la Pharmacopée Européenne. Les produits finaux de ces deux types de vaccins sont soumis à des tests d'innocuité et d'absence de toxicité.

Les vaccins à virus vivants destinés à la vaccination orale des animaux sauvages (ou domestiques) doivent subir des tests d'innocuité et d'efficacité chez les espèces cibles et des tests d'innocuité sur les espèces non-cible.

A. INTRODUCTION

La rage est due à un virus neurotrope du genre *Lyssavirus* de la famille des *Rhabdoviridae*, elle est transmissible à tous les mammifères. Comme elle est transmissible à l'homme par inoculation ou par inhalation de particules infectieuses, tout matériel suspect doit être manipulé dans les conditions de sécurité recommandées par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (45).

Sept lignées distinctes peuvent être distinguées au sein du genre *Lyssavirus* au moyen de tests de protection croisée ou par analyse génétique (6, 16, 26) à savoir : le virus rabique classique lui-même (RABV, génotype 1, sérotype 1), le virus Lagos bat (LBV, génotype 2, sérotype 2), le virus Mokola (MOKV, génotype 3, sérotype 3) et le virus Duvenhage (DUVV, génotype 4, sérotype 4). Le virus des chauves-souris européennes (EBLV), lui-même subdivisé en deux biotypes, EBLV1 (génotype 5) et EBLV2 (génotype 6) et le virus des chauves-souris australiennes (ABLV, génotype 7), isolé en Australie (30), font aussi partie du genre *Lyssavirus*, mais ils ne sont pas encore classés en sérotypes. Les virus des sérotypes 2 à 4, EBLV et ABLV sont connus comme des virus apparentés à la rage. L'utilisation d'anticorps monoclonaux (AcMs) spécifiques de la nucléocapside ou de la glycoprotéine et le séquençage de certaines zones du génome ont permis de subdiviser chaque sérotype en de nombreux sous-types. Les lyssavirus causent une maladie dont l'expression clinique n'est pas différente de la rage classique. Des sites antigéniques conservés sur les protéines de la nucléocapside permettent la reconnaissance de tous les lyssavirus avec des préparations commerciales de conjugué antirabique utilisé dans les épreuves de diagnostic sur tissu cérébral. Il existe deux phylogroupes de lyssavirus de pouvoirs pathogène et immunogène différents (5). Pour les virus RABV, DUVV, EBLV et ABLV, des sites antigéniques conservés sur la partie externe de la glycoprotéine permettent une neutralisation croisée et une protection croisée après vaccination antirabique. Il y a peu ou pas de protection croisée contre MOKV ou LBV après vaccination antirabique, et en outre la plupart des sérums antirabiques ne neutralisent pas ces lyssavirus. Quatre nouveaux virus apparentés au virus de la rage, (Aravan, Kujand, Irkut et les virus « West Caucasian bat viruses») ont été récemment isolés de chauve-souris d'Eurasie et sont provisoirement décrites comme de nouvelles espèces de lyssavirus. Les vaccins pré-exposition et les vaccins post-exposition classiques ont une efficacité diminuée contre ces quatre nouveaux variants du virus rabique (29).

Le personnel travaillant sur du matériel suspect doit être vacciné contre les lyssavirus et les autres agents pathogènes qui peuvent être présents dans les échantillons soumis pour diagnostic. Le laboratoire doit suivre les règles nationales de bioconfinement et de biosécurité pour protéger le personnel du contact des agents pathogènes. Il doit aussi suivre les recommandations du Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries ».

L'OMS recommande la vaccination préventive du personnel exposé. Le protocole d'immunisation comprend 3 injections aux jours 0, 7 et 28. Le contrôle sérologique de la réponse est fait 1 à 3 semaines après la dernière injection, il est suivi tous les 6 mois pour le personnel de laboratoire et tous les 2 ans dans les autres cas. Un rappel vaccinal est administré lorsque le titre devient inférieur à 0,5 UI par ml. En l'absence de contrôle sérologique, le régime vaccinal comprend un rappel à 1 an puis tous les 1 à 3 ans.

Comme aucun signe clinique ni aucune lésion macroscopique ne peuvent être considérés comme pathognomoniques de la rage chez les animaux domestiques ou sauvages, le diagnostic de cette maladie repose sur des épreuves de laboratoire. Le diagnostic sérologique de l'infection est rarement utile à cause de la séroconversion tardive et de la mortalité élevée chez l'espèce hôte, mais ces données peuvent tout de même être utilisées dans des enquêtes épidémiologiques.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

L'examen clinique ne peut conduire qu'à une suspicion de rage parce que les symptômes de la maladie ne sont pas caractéristiques et peuvent varier grandement d'un animal à l'autre (43). Le seul moyen d'établir un diagnostic fiable de rage est d'identifier le virus ou l'un de ses composants spécifiques au moyen d'épreuves de laboratoire.

Comme le virus rabique est rapidement inactivé, les échantillons suspects doivent être envoyés au laboratoire réfrigérés et par le moyen le plus rapide. Les conditions d'expédition font partie de la « chaîne de diagnostic de la rage ».

Plusieurs techniques de laboratoire peuvent être utilisées, elles sont détaillées dans la quatrième édition du manuel de l'OMS « *La rage – Techniques de laboratoire* » (45). Ces méthodes varient en efficacité, spécificité et fiabilité. Elles sont classiquement appliquées à du tissu cérébral, mais elles peuvent aussi être utilisées, bien qu'éventuellement de manière moins efficace, à d'autres tissus (les glandes salivaires par exemple). Dans l'encéphale, le virus est particulièrement abondant dans le thalamus, la protubérance annulaire et le bulbe rachidien. L'hippocampe (corne d'Ammon), le cervelet et différentes parties de l'encéphale donnent des résultats négatifs dans 3,9 à 11 % des encéphales infectés. La structure de choix est le thalamus qui donne un résultat positif dans tous les cas. Il est donc recommandé de collecter et de tester plusieurs échantillons d'encéphale en incluant la moelle épinière (13). Pour avoir accès à ces parties de l'encéphale, il est nécessaire de le retirer de la boîte crânienne après son ouverture en salle d'autopsie. Dans certaines conditions, (par exemple sur le terrain ou lors d'enquêtes épidémiologiques importantes), une méthode de prélèvement simplifiée par le trou occipital (11) ou par la cavité orbitale (32) peut être utilisée. La manipulation des différentes parties du système nerveux central en cas de suspicion de rage doit se faire précautionneusement. Il faut toujours porter des gants et éviter les aérosols. Instruments coupants, ciseaux et scalpels doivent être utilisés avec précaution pour éviter blessures et contamination.

a) Expédition des prélèvements

L'expédition de matériel suspect pour diagnostic (têtes, encéphales ou autres tissus) ne doit pas entraîner de risque de contamination humaine : les encéphales sont placés dans un contenant rigide et étanche (les têtes sont emballées dans une matière absorbante) selon les recommandations sur le transport des denrées dangereuses de l'Association Internationale du Transport Aérien (IATA). Ces recommandations sont résumées dans le Chapitre 1.1.1., « Prélèvement et expédition des échantillons pour le diagnostic ».

Lorsqu'il n'est pas possible de faire un envoi sous froid, d'autres techniques de préservation peuvent être employées. Le choix de la méthode de préservation conditionne l'utilisation des techniques utilisables pour le diagnostic :

- Le formol inactive le virus, les épreuves d'inoculation sont donc inutilisables et le diagnostic ne peut être fait que par IF avec une technique modifiée et moins sensible, par immunohistochimie ou histologie (39, 45) ;
- Le pouvoir infectieux peut être prolongé à température ambiante pendant plusieurs jours en maintenant l'encéphale dans un mélange de glycérol à 50 % dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS). Ce mélange glycérol/PBS ralentit la croissance bactérienne et protège par conséquent des effets toxiques et biologiques de la putréfaction. Il ne protège pas contre la baisse de titre due à la température, par conséquent, le virus rabique étant thermolabile, le titre viral va décroître au cours du temps pendant la conservation en glycérol/PBS. Dans les conditions de transport habituelles en milieu tropical, cette protection est efficace pour plusieurs jours. Par conséquent, chaque fois que cela est possible, les échantillons conservés en glycérol/PBS devraient être réfrigérés. Comme le mélange glycérol/PBS n'inactive pas le virus rabique, toutes les épreuves de laboratoire sont donc utilisables.

b) Récolte des prélèvements

En général, l'encéphale est prélevé après ouverture de la boîte crânienne en salle d'autopsie, les échantillons pour diagnostic sont prélevés ensuite par dissection. Cette étape peut être dangereuse si le personnel de laboratoire n'est pas entraîné ou sur le terrain. Il est alors possible d'utiliser une des deux méthodes de prélèvement sans ouverture du crâne :

- **Prélèvement par le trou occipital**

Une paille à boisson de 5 mm (11) ou une pipette à usage unique de 2 ml (17) est introduite par le trou occipital en direction d'un œil. Des échantillons sont ainsi collectés dans le bulbe rachidien, la base du cervelet, l'hippocampe et le cortex. Un diagnostic différentiel d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) doit être effectué chez la plupart des bovins « suspects de rage ». La collecte d'échantillons peut être faite au moyen de l'outil développé pour l'ESB plutôt qu'au moyen d'une paille ou d'une pipette. Les échantillons permettent une reconnaissance assez aisée des zones collectées.

- **Prélèvement par voie rétro-orbitale**

Cette technique (32) utilise un trocard pour perforer le fond de l'orbite, une pipette plastique est alors introduite par le trou. Les parties de l'encéphale échantillonnées sont les mêmes que celles prélevées par la technique précédente mais en sens inverse.

c) Épreuves de laboratoire de routine

Le diagnostic de laboratoire peut se faire à trois niveaux différents.

i) Identification immunochimique de l'antigène du virus rabique

- *Épreuve d'immunofluorescence*

L'épreuve la plus utilisée pour le diagnostic de rage est l'immunofluorescence (IF), elle est recommandée à la fois par l'OMS et l'OIE. Cette épreuve peut être utilisée directement sur un étalement, elle peut aussi être utilisée pour confirmer la présence de l'antigène rabique dans des cellules ou l'encéphale de souris inoculées pour diagnostic. Sur des prélèvements frais, l'IF donne des résultats fiables dans plus de 95 à 99 % des cas. La sensibilité de l'IF dépend de l'échantillon (de son degré d'autolyse et de la manière dont il a été prélevé voir la section B.1) (1, 9), du type de lyssavirus et de la compétence de l'équipe de diagnostic. Chez des animaux qui ont été vaccinés, la sensibilité de l'épreuve peut être inférieure à cause de la localisation de l'antigène, confiné au tronc cérébral. Pendant le diagnostic direct, les échantillons prélevés dans plusieurs zones de l'encéphale, y compris le tronc cérébral, sont fixés à froid dans le l'acétone pour analyse puis colorés avec une goutte de conjugué spécifique. Le conjugué antirabique fluorescent peut être préparé au laboratoire. Les conjugués commerciaux sont soit des conjugués polyclonaux spécifiques du virus entier ou de sa nucléocapside, soit un mélange de différents anticorps monoclonaux. Dans l'épreuve d'IF, les agrégats spécifiques de nucléocapside sont identifiés par leur fluorescence. La spécificité et la sensibilité de ces conjugués antirabiques fluorescents vis-à-vis des variants locaux du virus doit être contrôlée avant leur utilisation.

L'IF peut être utilisée sur des prélèvements conservés en glycérol. Si l'échantillon a été formolé, l'IF peut être réalisée après un pré-traitement de ce dernier par des enzymes protéolytiques (7, 8, 38, 39) Cependant, l'IF réalisée sur échantillons formolés puis traités reste moins fiable et plus lourde que lorsqu'elle est réalisée sur prélèvement frais.

- *Épreuves immunochimiques*

Les anticorps peuvent être conjugués à une enzyme comme la peroxydase au lieu de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Ce conjugué peut être utilisé pour un diagnostic direct avec la même sensibilité que l'IF (27), mais avec un risque de résultats non spécifiques faussement positifs. Ce risque est considérablement réduit lorsque les techniciens sont bien formés. Il faut aussi souligner que cette technique nécessite une incubation supplémentaire par rapport à l'IF.

Le conjugué peroxydase peut être utilisé dans des épreuves immunohistochimiques sur des coupes de tissus fixés au formol.

ii) Détection de la réplication du virus rabique après inoculation

Ces épreuves détectent l'infectiosité d'une suspension tissulaire pour des cellules en culture ou des animaux de laboratoire. Ils devraient être utilisés à chaque fois que l'IF donne un résultat douteux ou lorsque l'IF donne un résultat négatif et qu'il y a eu exposition humaine.

- *Épreuve sur culture cellulaire*

Des lignées cellulaires de neuroblastomes, comme la lignée CCL-131 de l'American Type Culture Collection (ATCC)¹ sont utilisées pour le diagnostic de routine de la rage. Les cellules sont cultivées dans du milieu d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 5 % de sérum de veau fœtal (SVF) à 36 °C avec 5 % de CO₂. La sensibilité des neuroblastomes a été comparée à celle des cellules de rein de hamster nouveau-né (BHK-21) (34). Cette lignée de neuroblastomes est sensible aux isolats sauvages sans aucun temps d'adaptation, mais elle devrait être testée vis-à-vis des variants locaux du virus rabique avant d'être utilisée. La présence du virus rabique dans les cellules est mise en évidence par IF. Le résultat est obtenu après au moins 18 h d'incubation (durée d'un cycle de réplication du virus dans les cellules); en général l'incubation est prolongée de 48 h (10) voire de 4 jours dans certains laboratoires.

Cette épreuve est aussi sensible que l'épreuve d'inoculation à la souris. Lorsqu'un service de culture cellulaire existe dans le laboratoire, cette épreuve devrait remplacer cette dernière épreuve, car elle évite l'utilisation d'animaux vivants, elle est moins coûteuse et donne des résultats plus rapidement.

Il est souvent conseillé d'utiliser plus d'une épreuve par échantillon, au moins lorsqu'il y a eu exposition humaine.

- *Épreuve d'inoculation à la souris*

Cinq à dix souris de 3 à 4 semaines (soit de 12 à 14 g) ou une portée de souriceaux nouveau-nés de 2 jours, sont inoculés par voie intracérébrale. L'inoculum est le surnageant clarifié d'un broyat à 20 % (poids/volume) de tissus nerveux (cortex, cornes d'Ammon, cervelet, bulbe rachidien) dans un tampon isotonique contenant des antibiotiques. Pour réduire la souffrance animale, les souris doivent être anesthésiées lors de l'inoculation. Les souris sont contrôlées tous les jours pendant 28 jours, toute souris qui meurt pendant la période d'observation est testée par IF. L'utilisation de souriceaux permet d'obtenir des résultats plus rapidement, et il est possible de contrôler un souriceau par IF 5, 7, 9 et 11 jours après l'inoculation. Toute mort survenant durant les quatre premiers jours sera considérée comme non spécifique (due au stress/à une infection bactérienne etc.).

Cette épreuve *in vivo* devrait être remplacée lorsque c'est possible, pour respecter le bien-être animal. Elle est également coûteuse, surtout si elle utilise des souris exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS), et elle ne donne pas une réponse rapide par rapport aux épreuves d'inoculation *in vitro*. En revanche, lorsqu'elle est positive, une grande quantité de virus peut être isolée d'un seul encéphale de souris pour le typage de la souche. Un autre avantage de cette épreuve peu sophistiquée est qu'elle peut être facilement utilisée en pratique dans des situations où les compétences et les conditions matérielles ne permettent pas d'utiliser d'autres épreuves (comme les cultures cellulaires).

iii) Identification histologique des lésions cellulaires caractéristiques

Les corps de Negri sont constitués par l'agrégation de protéines virales, mais les techniques de coloration classiques ne révèlent que l'affinité de ces structures pour les colorants acidophiles. Les épreuves immunochimiques sont les seules épreuves histologiques spécifiques de la rage.

Un étalement non fixé de tissus peut être coloré par la méthode de Sellers, permettant un diagnostic en moins d'une heure. Les examens histologiques, tels que ceux utilisant la coloration de Mann, sont généralement réalisés sur du matériel fixé inclus en bloc de paraffine et donnent un résultat en trois jours. Ces techniques ont l'avantage de ne pas nécessiter d'équipement de laboratoire coûteux ni d'obliger à conserver les prélèvements fixés sous froid. Quelle que soit la méthode utilisée, l'infection est démontrée par la présence de corps d'inclusion acidophiles intracytoplasmiques. Les méthodes histologiques, notamment la méthode de Sellers, ne peuvent plus être recommandées car elles sont très peu sensibles. Elles doivent donc être abandonnées.

d) Autres épreuves d'identification

Le test immuno-enzymatique ELISA qui détecte l'antigène rabique est une variante de l'épreuve immunochimique. Il est utile pour les grandes enquêtes épidémiologiques (46). Il ne doit être utilisé qu'après validation sur de nombreux prélèvements et dans différents laboratoires. La spécificité et la sensibilité des enzymes conjuguées antirabiques vis-à-vis des variants du virus prédominants dans la région doivent être vérifiées avant usage. L'ELISA doit être associé à un test de confirmation tel que l'IF ou l'isolement du virus.

Les épreuves précédemment décrites permettent de bien diagnostiquer la rage et d'isoler puis d'identifier le virus. Le typage de ces virus peut apporter d'utiles informations et doit être réalisé dans des laboratoires spécialisés (notamment les laboratoires de référence de l'OIE et de l'OMS). Pour réaliser ce typage, les techniques pourront recourir aux anticorps monoclonaux, aux sondes nucléiques ou à la PCR, puis au séquençage de certaines parties du génome (17). Cette caractérisation du virus permet de distinguer les

1 American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, Virginia 20108, États Unis d'Amérique.

souches vaccinales des souches sauvages, et de déterminer éventuellement l'origine géographique de ces dernières.

2. Épreuves sérologiques

Les épreuves sérologiques sont rarement utilisées lors d'enquêtes épidémiologiques en raison de la séroconversion tardive et du faible pourcentage d'animaux qui survivent à la maladie et qui pourraient donc présenter des anticorps post-infection. La principale application de la sérologie est de déterminer la réponse à la vaccination des animaux domestiques avant un déplacement international ou celle d'espèces sauvages réservoirs du virus après vaccination par voie orale. Pour le suivi des campagnes de vaccination orale, des épreuves de séroneutralisation virale sur cultures cellulaires sont préférées. Cependant, si des sérums de faible qualité sont analysés, l'épreuve de séroneutralisation sur culture cellulaire peut conduire à des réactions faussement positives du fait de la cytotoxicité des sérums. Pour de tels échantillons, un test ELISA indirect utilisant des plaques tapissées de glycoprotéine du virus rabique s'est montré aussi sensible et spécifique que l'épreuve de neutralisation sur cellules (22).

a) Épreuve de neutralisation virale par anticorps fluorescents : *fluorescent antibody virus neutralisation test* (FAVN) (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Le principe du FAVN (21) est une neutralisation *in vitro* d'une quantité constante de virus rabique (souche de CVS : « challenge virus standard » adaptée à la culture cellulaire) avant d'inoculer des cellules sensibles au virus rabique : cellules BHK-21 C13 (ATCC numéro CCL-10).

Le titre du sérum est la dilution pour laquelle on observe 100 % de neutralisation virale dans 50 % des puits lus. Ce titre est exprimé en unité internationale par millilitre (UI/ml) en le comparant à la dilution neutralisant un étalon titré dans les mêmes conditions (sérum OIE d'origine canine ou étalon d'immunoglobulines antirabiques humaines de l'OMS N°2 ou alors les deux). Un sérum témoin interne calibré vis-à-vis des références internationales peut être utilisé. Le sérum étalon de l'OMS [homme]² N°2 ou le sérum interne ne doivent être utilisés qu'à titre de témoins dans l'épreuve, et non pour déterminer le titre du sérum en UI/ml.

Cette méthode en microplaques utilise des plaques à 96 puits, et est une adaptation de la technique décrite par Smith *et al.* (36), modifiée par Zalan *et al.* (47) et par Perrin *et al.* (33). Plusieurs publications (18, 21) ont montré que les épreuves FAVN et d'inhibition rapide des foyers fluorescents, « *rapid fluorescent focus inhibition test* » (RFFIT), donnaient des résultats équivalents.

• Équipement de base

Un incubateur humide à 35 – 37 °C avec 5 % de CO₂, une étuve sèche à 37 °C, une hotte à flux laminaire ou PSM, un microscope permettant de faire de la fluorescence avec le FITC équipé d'un objectif × 10 et d'un oculaire × 10. Le grossissement global du système optique est compris entre × 100 et × 125 à cause de l'agrandissement supplémentaire dû à certains équipements intercalés dans l'épi-fluorescence.

• Réactifs chimiques et biologiques

Tampon PBS, pH 7.2, sans Ca²⁺ ni Mg²⁺, conservé à 4 °C,

Trypsine EDTA,

Acétone pour analyse (diluée à 80 % dans de l'eau désionisée), conservée à 4 °C,

Du milieu d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 10 % de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur,

Un conjugué antirabique couplé à la fluorescéine,

Cellules : BHK-21 C13 (ATCC CCL-10),

Virus : CVS-11 (ATCC VR 959) qui peut être obtenu de l'ATCC ou du Laboratoire de référence de l'OIE pour la rage de Nancy en France (voir le tableau de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Les tubes sont conservés à –80 °C.

Le sérum de référence de l'OIE d'origine canine (Laboratoire de référence pour la rage de l'OIE, Nancy, France [voir la table de la partie 3 de ce manuel] conservé à +4 °C et dilué pour obtenir 0,5 UI/ml dans de l'eau stérile désionisée ou distillée selon le titre du lot.

2 National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG, Royaume-Uni

Sérum sans anticorps rabiques (« naïf ») : Le pool de sérums canins sans anticorps rabiques (négatifs) est conservé à -20 °C

- **Production de CVS**

- Croissance des cellules :** les cellules BHK-21 C13 (ATCC CCL-10) qui servent à produire la souche CVS (ATCC VR 959, CVS 11), sont trypsinées durant la phase de croissance rapide, c'est-à-dire lorsque les cellules sont en phase de croissance exponentielle. Si le tapis est totalement confluent, un nouveau passage doit être effectué. Les cellules de la suspension cellulaire ne doivent pas être agglomérées; pour ensemercer un flacon de 75 cm², il faut 2×10^7 cellules. Les cellules sont récupérées dans un volume de 20-30 ml de milieu pour cultures cellulaires contenant 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté.
- Infection des cellules :** la multiplicité d'infection (nombre de particules infectieuses par cellule) est ajustée entre 0,1 et 0,5. Le flacon qui contient la suspension cellulaire et le virus est incubé pendant 60 min entre 35,5 et 37 °C. Ce flacon est délicatement agité toutes les 10 à 15 min.
- Multiplication du virus :** la suspension de cellules infectées est ensuite centrifugée à 800 -1 000 **g** pendant 15 min et le culot cellulaire est resuspendu délicatement dans un milieu de culture cellulaire contenant 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté. Le virus est récolté 2 jours plus tard.
- Récolte et stockage :** le surnageant est centrifugé à 800 -1 000 **g** pendant 15 min à 4 °C. Si plusieurs flacons ont été utilisés, les différents surnageants centrifugés sont mélangés puis aliquotés et congelés et conservés à -80 °C. Le titre infectieux de la récolte est établi 3 jours plus tard.

- **Titrage du virus en DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire)**

Cette méthode de titrage se fait sur microplaque avec des cellules BHK-21 C13 (ATCC CCL-10).

Différentes étapes de cette procédure peuvent être adaptées aux conditions de sécurité et aux pratiques de travail du laboratoire, mais les points suivants ne doivent pas être modifiés :

- Inoculation d'un tapis cellulaire de 24 h,
 - Dilutions au 1/10 en série avec 0,9 ml de diluant et 0,1 ml de suspension virale,
 - Six réplicats de 50 µl par dilution,
 - Incubation de 72 h,
 - Lecture qualitative (c'est-à-dire, puits positif ou négatif),
 - Dans tout titrage, un tube de virus témoin identique est titré et le titre de ce virus témoin est inclus dans une carte de contrôle qui permet la validation du titrage en cours,
 - Le calcul se fait selon la méthode graphique des néoprobit ou la méthode de Spearman-Kärber.
- Suspension cellulaire :** la veille du titrage, une suspension cellulaire contenant 10⁵ cellules par ml est préparée dans un milieu contenant 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté, et 200 µl de ce milieu sont distribués dans les puits d'une plaque à 96 trous. La plaque est ensuite incubée 24 h entre 35,5 et 37 °C avec 5 % de CO₂.
 - Dilution du virus :** des dilutions en série sont effectuées dans des tubes de 5 ml en utilisant un milieu pour culture cellulaire sans sérum de veau fœtal comme diluant. Des dilutions au dixième de 10⁻¹ à 10⁻¹² sont préparées (0,9 ml avec 0,1 ml de la dilution précédente).
 - Infection des cellules :** le milieu contenu dans les puits de la microplaque est éliminé au moyen d'un système d'aspiration. Cinquante µl de chaque dilution virale sont distribués par puits. Six réplicats sont effectués par dilution. La microplaque est ensuite incubée pendant 1 h entre 35,5 et 37 °C avec 5 % de CO₂. Puis 200 µl de milieu de culture cellulaire avec 5 % de sérum de veau fœtal, sont ajoutés.
 - Incubation :** incubé 3 jours entre 35,5 et 37 °C avec 5 % de CO₂.
 - Coloration et calcul du titre :** le tapis cellulaire est coloré par IF comme il est indiqué ci-dessous. La lecture est qualitative, chaque puits qui présente une fluorescence spécifique est considéré comme positif. Le calcul du titre se fait soit par la méthode graphique des néoprobits (2) soit par la formule de Spearman-Kärber.
 - Pour déterminer la dose infectante en DICT₅₀, le titrage du CVS doit se faire par le test FAVN.

- iv) Les dilutions des sérums sont effectuées dans les microplaques selon la procédure suivante :

Le sérum OIE, le sérum OMS, le témoin interne et le sérum négatif : avec une pipette multicanaux 50 à 200 µl, mélanger les puits de la première dilution en effectuant au moins 8 aspirations et refoulements, transférer 50 µl d'une colonne à la suivante, jusqu'à ce que la dernière soit atteinte. Éliminer 50 µl de la dernière colonne.

Si un sérum doit être testé dans les plaques témoins, voir ci-dessous les différentes étapes de sa dilution.

Il faut au moins quatre dilutions de 3 en 3.

Les sérums à tester (dans toutes les plaques) : comme précédemment, transférer 50 µl d'une colonne à l'autre jusqu'aux colonnes 5 et 11 (soit la dilution $10^{-2,39}$). Avec une pipette multicanaux de 5 à 50 µl, transférer 10 µl de la colonne 5 et de la colonne 11 aux colonnes 6 et 12 respectivement (de la dilution $10^{-2,39}$ à la dilution $10^{-4,23}$). Avec une pipette multicanaux réglée à 90 µl, mélanger les colonnes 6 et 12 et éliminer 180 µl. Ajouter ensuite 70 µl de milieu dans ces colonnes. Cette dernière étape n'est pas toujours compatible avec un grand nombre d'analyses. Des procédures alternatives peuvent être utilisées pour atteindre ou dépasser la dilution finale recommandée, ce qui peut nécessiter un réarrangement de la plaque.

- **Ajout du virus**

- i) Le stock de CVS est conservé dans des microtubes de 1 ml à -80°C . Un tube est décongelé rapidement sous l'eau courante froide, et placé dans de la glace fondante.
- ii) Une dilution du contenu de ce tube est effectuée pour obtenir 100 DICT₅₀ dans 50 µl. 50 µl de cette dilution sont ajoutés à chacun des puits contenant les dilutions de sérum (voir figure 1). Pour le titrage des virus, 50 µl sont ajoutés dans les puits H1 à H4 (plaque 1). Ensuite, transférer 50 µl de colonne en colonne (plaque 1, lignes 1 à 4). Rejeter 50 µl de la dernière colonne (plaque 1, puits A1 à A4). Aucun virus n'est mis dans les puits A9 à A12 de la première plaque (témoin cellulaire). La quantité de virus peut varier de 30 à 300 DICT₅₀ dans 50 µl.
- iii) Incuber les microplaques à $35 - 37^{\circ}\text{C}$ dans un incubateur humide avec 5 % de CO₂ pendant 1 h.
- iv) *Ajout des cellules* : trypsiner une culture de cellules BHK-21 presque confluite de 3 jours. Remettre en suspension les cellules pour obtenir une suspension de 4×10^5 cellule/ml dans du DMEM contenant 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté. Ajouter 50 µl de cette suspension cellulaire par puits.
- v) Incuber les microplaques 48 h à $35 - 37^{\circ}\text{C}$ dans un incubateur humide avec 5 % de CO₂.

- **Fixation et coloration**

- i) Après la période d'incubation de 48 h, le milieu est rejeté et les microplaques sont rincées 1 fois en PBS, pH 7,2, et 1 fois dans de l'acétone à 80 %. Les microplaques sont ensuite fixées dans l'acétone à 80 % à température ambiante pendant 30 min. puis séchées à température ambiante pendant au moins 30 min.
- ii) Ajouter 50 µl de conjugué fluorescent antirabique, à sa dilution de travail, à chacun des puits, agiter délicatement les microplaques pour répartir le conjugué et incuber à $35 - 37^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min. Éliminer le conjugué fluorescent et rincer les microplaques 2 fois au PBS. L'excès de PBS est rejeté en retournant rapidement les microplaques sur un papier absorbant.

- **Lecture et interprétation des résultats**

- i) La surface totale de chaque puits est observée. La méthode de lecture est qualitative (en plus ou moins) : si le puits ne contient aucune cellule fluorescente, le résultat est négatif, si une ou plusieurs cellules fluorescentes sont observées, le résultat est positif.
- ii) Les témoins cellules et virus sont lus en premier. Pour le titrage du CVS, du sérum naïf (négatif) et du sérum étalon OIE, les titres sont calculés selon la méthode de Spearman-Kärber ou la méthode graphique des néoprobites (2).
- iii) Les résultats du titrage du CVS (DICT₅₀), du sérum négatif (D₅₀, [dose médiane]), de l'étalon positif (D₅₀) sont rapportés chacun sur leur propre carte de contrôle. Les résultats des témoins de l'épreuve en cours sont comparés aux résultats obtenus lors des épreuves précédentes utilisant le même lot témoin. L'épreuve est validée si les valeurs obtenues pour les 3 témoins de l'épreuve en cours ne sont pas statistiquement différentes de la moyenne (+/- 2 écarts-types) de toutes les valeurs obtenues dans les épreuves conduites avec cette technique.
- iv) Le résultat de l'épreuve correspond au titrage du virus non neutralisé après incubation avec le sérum de référence ou les sérums à titrer. Ces titres sont calculés avec la méthode graphique des néoprobites

(2) ou la formule de Spearman-Kärber (45). La comparaison des titres mesurés du sérum à tester avec celui obtenu avec l'étalon positif OIE de titre connu permet la détermination du titre neutralisant des sérums analysés en UI/ml. La conversion en UI/ml peut être faite en utilisant soit la valeur log D₅₀ du jour, soit la valeur moyenne du sérum étalon de l'OIE.

- Formule pour convertir la valeur log D₅₀ en titre UI/ml :

$$\text{Titre du sérum (UI/ml)} = \frac{[(10^{(\text{valeur log D}_{50} \text{ du sérum})}) \times \text{titre théorique du sérum OIE 0,5 UI/ml}]}{(10^{(\text{log D}_{50} \text{ du sérum OIE 0,5 UI/ml})})}$$

Exemple de conversion :

- log D₅₀ du sérum = 2,27
- Titre théorique du sérum OIE 0,5 UI/ml = 0,5 UI/ml
- log D₅₀ du sérum OIE = 1,43

(pour le log D₅₀ du sérum OIE, on peut utiliser soit la valeur du jour soit la valeur moyenne)

$$\text{Titre du sérum (UI/ml)} = \frac{[(10^{2,27} \times 0,5 = 3,46 \text{ UI/ml}]}{(10^{1,43})}$$

Les paramètres suivants doivent être strictement respectés :

- Virus rabique : n'utiliser que la souche CVS-11 (numéro ATCC = VR 959).
- Culture de cellules : n'utiliser que des cellules BHK-21 (numéro ATCC– CCL 10).
- Le test FAVN ne doit être réalisé que dans des microplaques à 96 trous.
- Utiliser des cartes de contrôle pour le virus rabique, le sérum négatif et le sérum étalon OIE
- Une microplaque de contrôle doit être prévue pour le titrage a posteriori du virus CVS ainsi que pour celui du sérum négatif et du sérum OIE.
- Prévoir au moins quatre dilutions de 3 en 3 des sérums. La lecture ne se fait qu'en mode « tout ou rien ».
- Diluer quatre réplicats de chaque sérum.
- Pour convertir les log D₅₀ en UI/ml, les laboratoires n'utiliseront que la valeur de la log D₅₀ du sérum étalon OIE d'origine canine.

b) L'épreuve d'inhibition rapide des foyers fluorescents (*Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test, RFFIT*) pour la détermination des anticorps neutralisants (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

- **Protocole de référence (La rage : techniques de laboratoire OMS, 1996 [45])**

- **Préparation de la suspension du virus de semence**

- Trypsiner un flacon de culture cellulaire de 150 ml de 3 jours de neuroblastomes murins (MNA). Ces cultures poussent mieux dans un milieu acide, complété avec des vitamines (40). Une lignée cellulaire similaire (CCL-131) peut être obtenue sur demande à l'ATCC (voir note de bas de page 1).
- Resuspendre 3×10^7 cellules dans un tube à centrifuger de 50 ml à fond conique dans 2,7 ml de milieu essentiel minimum d'Eagle contenant 10 % de sérum de veau fœtal (EMEM-10).
- En respectant les procédures de sécurité classiques de la rage, ajouter 1×10^7 unités infectieuses de CVS-11 (ATCC, VR959) et agiter sur un vortex une fois. Incuber les cellules et le virus 15 min à 37 °C, mélanger les cellules une fois pendant cette incubation.
- Ajouter 10 ml de EMEM-10, mélanger, et centrifuger les cellules à 500 *g* pendant 10 min.
- Éliminer le surnageant. Reprendre les cellules dans 30 ml de milieu de croissance et transférer l'ensemble dans un flacon de 150 ml.

- vi) Agiter doucement le flacon pour homogénéiser la suspension cellulaire, puis préparer 3 plaques de culture cellulaire à 8 chambres en pipetant 0,2 ml de suspension cellulaire dans un puits de chacune des lames.
- vii) Incuber le flacon et les lames à 37 °C dans un incubateur humide avec 0,5 % de CO₂. Le flacon doit être incubé fermé.
- viii) Vingt, 40 et 64 h après l'infection; fixer à l'acétone et colorer une lame au moyen de la technique d'immunofluorescence (28) pour suivre la multiplication du virus. Le surnageant doit être récolté 24 h après que 100 % des cellules aient été infectés (classiquement 40 h après l'infection).
- ix) Transférer le surnageant dans un tube de 50 ml et centrifuger à 4 000 *g* pendant 10 min.
- x) Distribuer le surnageant en aliquots de 0,5 ml et congeler à –70 °C.

- **Titration de la suspension du virus de semence**

- i) Décongeler une aliquote du virus semence et préparer une série de dilutions au 1/10 (de 10⁻¹ à 10⁻⁸) dans du EMEM-10.
- ii) Distribuer 0,1 ml de chaque dilution dans un puits d'une lame de culture à 8 chambres. Ajouter 0,2 ml d'une suspension de neuroblastomes dans du EMEM-10 (5 × 10⁴ cellules par 0,2 ml) à chaque puits.
- iii) Mélanger les cellules et le virus par agitation douce de la lame, puis incuber à 37 °C dans un incubateur humide à 0,5 % de CO₂ pendant 40 h.
- iv) Fixer à l'acétone et colorer la lame par la technique d'immunofluorescence. L'infection du virus doit être observée à la dilution 10⁻⁶ du virus, ce qui signifie que le titre du virus est au moins de 10⁶ unités infectieuses par 0,1 ml. Préparer suffisamment de stock de semence pour éviter des passages en série trop fréquents.

- **Préparation de la suspension du stock de virus**

- i) Infecter 3 × 10⁷ cellules de neuroblastomes avec 10⁷ unités infectieuses de virus semence (voir ci-dessus).
- ii) Récolter le surnageant 24 h après que les cellules aient été totalement infectées (classiquement après 40 h).
- iii) Distribuer le surnageant en aliquots de 0,5 ml et stocker à –70 °C.

- **Titration de la suspension du stock de virus**

- i) Décongeler une aliquote du virus d'utilisation et l'utiliser pour préparer des dilutions en série (de 10⁻¹ à 10⁻⁶) dans du EMEM-10.
- ii) Distribuer 0,1 ml de chaque dilution dans chaque puits d'une lame de culture cellulaire à 8 chambres. Ajouter 0,2 ml de suspension de neuroblastomes contenant 1 × 10⁵ cellules par 0,2 ml dans du EMEM-10.
- iii) Mélanger cellules et virus par agitation douce de la lame puis incuber à 37 °C dans une étuve humide à 0,5 % de CO₂ pendant 20 h.
- iv) Fixer à l'acétone et colorer la lame en utilisant la technique d'immunofluorescence.

La lame de culture à 8 chambres correspond à 25-50 champs microscopiques différents lorsque l'on observe le tapis à un grossissement compris entre 160 et 200. Une unité pour le RFFIT est définie comme une dilution à laquelle 50 % de champs microscopiques observés sur le tapis contiennent au moins un foyer de cellules infectées (dose formant 50 % de foyer, DFF₅₀). Le virus d'utilisation doit contenir au moins 1 × 10⁴ FFD₅₀ par 0,1 ml (c'est-à-dire que le puits correspondant à la dilution 10⁻⁴ de virus doit contenir au moins un foyer de cellules infectées dans la moitié des champs microscopiques lus). Un stock de ce titre peut alors être dilué à 10^{-2,3} pour obtenir une dose d'épreuve de 50 FFD₅₀.

- **Sérums de référence**

Un sérum de référence national ou international dilué pour obtenir un titre de 2,0 UI/ml doit être inclus dans chaque épreuve. Le sérum de référence utilisé au « Center for control disease and prevention » (CDC) est la première préparation internationale d'immunoglobulines antirabiques (41), qui peut être obtenue auprès du NIBSC (voir note de bas de page 2). Le sérum de référence est conservé sous forme d'aliquotes

congelées correspondant chacun à une semaine d'épreuve. Chaque épreuve doit aussi inclure un sérum positif de référence de titre 0,5 UI/ml et un témoin négatif de titre inférieur à 0,1 UI/ml préparé par le laboratoire.

- **Sérums à tester**

Les échantillons de sérum sont chauffés 30 min à 56 °C avant l'épreuve de façon à inactiver le complément. Si les sérums sont congelés, ils doivent être réchauffés après décongélation. Des dilutions en série des sérums à tester peuvent être préparées dans une lame à 8 chambres. Les dilutions de 1/5 et 1/50 sont suffisantes pour une évaluation en routine de l'efficacité de la vaccination et peuvent être effectuées comme suit :

- Préparer une dilution à 1/2,5 en ajoutant 0,1 ml de sérum inactivé à 0,15 ml de EMEM-10 dans une des lames. Mélanger par agitation douce de la lame.
- Transférer 0,05 ml de la dilution 1/2,5 à un second puits contenant 0,45 ml de EMEM-10. Conserver 0,1 ml dans le puits de la dilution 1/2,5.
- Mélanger le second puits et ne conserver que 0,1 ml.
- Ajouter 0,1 ml du virus d'épreuve (contenant 32-100 FFD₅₀) à toutes les dilutions de sérums.
- Mélanger et incuber à 35 °C en atmosphère humide avec 0,5 % de CO₂ pendant 90 min.

- **Ajout des cellules**

- Pendant la période d'incubation, trypsiner un flacon de neuroblastomes de 3 à 5 jours.
- Remettre les cellules en suspension dans du EMEM-10 pour obtenir 1×10^5 cellules par 0,2 ml.
- Distribuer 0,2 ml de suspension cellulaire dans chaque chambre de culture et incuber à 35 °C en atmosphère humide avec 0,5 % de CO₂ pendant 20 h.

- **Fixation à l'acétone et coloration en immunofluorescence**

- Après 20 h, sortir les lames de l'incubateur et transférer le milieu dans une solution virucide.
- Rincer les lames une fois en PBS puis fixer 10 min à température ambiante avec de l'acétone froide (-20 °C).
- Laisser les lames sécher 10 min avant de distribuer le conjugué fluorescent. Le conjugué peut être préparé dans du EMEM-10 ou du PBS ; il n'est pas nécessaire d'absorber le conjugué avec des tissus ou des cellules sains. La dilution de travail du conjugué doit être déterminée par titrage. Les lames sont colorées 20 à 30 min à 37 °C puis rincées avec du PBS puis de l'eau distillée.
- Lire en fluorescence.

- **Calcul des titres neutralisants**

Le virus résiduel est détecté par lecture en fluorescence. Le point final de neutralisation du sérum est défini comme la plus haute dilution du sérum où 50 % des champs observés contiennent une ou plusieurs cellules infectées (c'est-à-dire une réduction de 97 % de l'inoculum viral). Cette valeur peut être obtenue par interpolation mathématique. De manière alternative, un titre neutralisant à 100 % peut être déterminé en notant la plus haute dilution du sérum pour laquelle 100 % du virus d'épreuve est neutralisé et qui ne présente aucune cellule infectée dans aucun des champs microscopiques observés. Dans les deux méthodes de titrage, le titre en anticorps du sérum testé (en UI/ml) est obtenu par comparaison avec le titre de la référence incluse dans chacune des épreuves. Il est aussi possible d'effectuer un RFFIT sur des cellules BHK-21 au lieu de neuroblastomes. Un protocole modifié a été publié (45).

Les paramètres suivants seront strictement respectés :

- Virus rabique : n'utiliser que la souche CVS-11 (numéro ATCC = VR 959).
- Cultures de cellules : n'utiliser que des cellules BHK-21 (numéro ATCC– CCL 10) ou des cellules MNA (numéro ATCC– CCL 131)
- Le test ne doit être réalisé que sur des lames à chambres Labteck.
- Utiliser des cartes de contrôle pour le virus rabique, le sérum négatif et le sérum étalon OIE.
- Une lame de contrôle doit être prévue pour le titrage a posteriori du virus CVS ainsi que pour celui du sérum négatif et du sérum OIE.

- Pour lire le test : 25 à 50 champs doivent pouvoir être observés sur chaque lame, au grossissement $\times 160$ - $\times 200$.
- Prévoir au moins des dilutions des sérums de 3 en 3 ou de 5 en 5.
- Pour convertir les log D_{50} en UI/ml, n'utiliser que la valeur de la log D_{50} du sérum étalon OIE d'origine canine.

c) Séroneutralisation sur souris

Cette méthode n'est plus recommandée ni par l'OIE ni par l'OMS, et doit donc être abandonnée.

d) Méthode immuno-enzymatique (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Il existe dans le commerce des kits de diagnostic ELISA indirect. Ils permettent la détection qualitative des anticorps anti-rabique dans le sérum de chiens ou de chats vaccinés. En accord avec les recommandations de l'OMS, (41), 0,5 UI/ml est la quantité minimale (mesurable) d'anticorps rabiques considérée comme reflétant un niveau d'immunité corrélé à une protection contre l'infection rabique. L'ELISA est une épreuve rapide (réalisable en moins de 4 heures) qui évite de manipuler du virus rabique vivant lorsqu'on veut savoir si des chiens ou des chats vaccinés ont élaboré des anticorps (« séroconversion »). La sensibilité et la spécificité de tout kit utilisé doivent être déterminées par comparaison aux techniques de neutralisation virale. L'ELISA est un test prescrit pour les échanges internationaux de chiens et de chats, à condition que le kit ait été validé et inscrit au registre de l'OIE comme utilisable à cette fin (voir http://www.oie.int/vcda/fr/fr_VCDA_registre.htm?e1d9). Si on le souhaite, les épreuves de neutralisation virale peuvent être utilisées pour confirmer les résultats de l'ELISA.

Les méthodes ELISA peuvent être également utiles pour suivre les campagnes de vaccination de populations animales sauvages, à condition que les kits utilisés aient été validés pour l'espèce suivie.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Les vaccins antirabiques préparés à partir de la souche originale de Pasteur en 1885 et des souches dérivées (Pasteur Virus, Challenge Virus Standard, Pitman-Moore, etc.), et les souches isolées plus récemment (Flury, Street-Alabama-Dufferin [SAD], Vnukovo and Kelev) protègent contre toutes les souches de génotypes 1 isolées jusqu'ici. Les vaccins antirabiques conventionnels peuvent ne pas induire de protection croisée suffisante contre les autres lyssavirus, notamment ceux du phylogroupe II, aucune protection n'étant assurée contre le virus Mokola (37) et le virus « West Caucasian Bat Virus » récemment identifié (29). Il y a réaction de neutralisation croisée avec deux virus du phylogroupe I (EBLV type-1 et EBLV type-2), si on emploie des vaccins à virus rabiques traditionnels (20). Les principes qui gouvernent la préparation des vaccins antirabiques à virus inactivés sont identiques, que ces vaccins soient utilisés chez l'homme ou chez l'animal, bien que des adjuvants puissent être ajoutés aux vaccins à usage vétérinaire.

Les vaccins recombinants (par exemple vaccin recombinant vaccine-glycoprotéine rabique) ont aussi montré leur efficacité (19,31). Ces vaccins ne sont pas des vaccins à virus rabique vivant. Ils sont obtenus en insérant le gène de la glycoprotéine rabique dans un vecteur tel que le virus de la vaccine ou celui de la variole du canari (canary pox). Étant donné que les vaccins recombinants avec la glycoprotéine rabique ne contiennent pas de virus rabique vivant, les animaux auxquels ils ont été administrés peuvent entrer dans les pays interdisant l'importation d'animaux ayant reçu des vaccins à virus rabique vivant.

Les vaccins à virus rabique vivant et les vaccins recombinants sont efficaces par voie orale et peuvent être distribués dans des appâts pour immuniser les animaux sauvages (ou domestiques).

Les lignes directrices pour la fabrication des vaccins vétérinaires sont données au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices qui sont données ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont générales par essence et peuvent être complétées par des exigences nationales ou régionales.

Les normes qui s'appliquent aux vaccins à virus vivant modifié par passage sur œuf ou culture cellulaire pour réduire la virulence sur espèces cibles sont différents de ceux qui s'appliquent aux vaccins à virus inactivés. Les deux types de vaccins ont leurs avantages et leurs inconvénients (6), mais ils peuvent tous deux être utilisés pour immuniser l'animal pour une période de 1 à 3 ans. Les vaccins à virus vivant atténué ne sont pas acceptés dans certains pays. On ne peut pas les utiliser pour protéger des animaux non vaccinés qui ont été exposés à l'infection (15). L'efficacité du traitement post-exposition par vaccination n'a été démontrée que chez l'homme et dans certains cas, il est même fortement recommandé d'administrer en plus des immunoglobulines antirabiques.

Toute manipulation du virus pendant la préparation et le test des vaccins doit se faire en stricte conformité avec les précautions de sécurité recommandées par l'OMS (43, 45), l'OIE (Chapitre 1.1.2.) et les réglementations et les recommandations nationales.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Toute souche de sérotype 1 qui a montré qu'elle protégeait contre des souches sauvages de virus rabique (trouvées actuellement dans le pays où le vaccin va être utilisé) peut convenir. La souche de virus utilisée doit avoir les caractéristiques biologiques bien connues (par exemple sa pathogénicité) ainsi que des propriétés antigéniques connues (typage par des anticorps monoclonaux). Si la souche doit être utilisée comme vaccin à virus vivant, le stock de semence doit démontrer qu'il n'entraîne aucune rage clinique. Au moins 2 animaux (de préférence 5 à 6 par groupe) de chaque espèce susceptible de recevoir ce vaccin et, autant que possible, toute espèce qui pourrait être en contact avec le vaccin ou un animal vacciné doit être testé. Ceci peut être fait par inoculation dans un nerf ou en zone péri-nerveuse d'une dose équivalente à 10 fois la dose qui sera proposée dans le produit final. Les animaux sont observés pendant au moins 90 jours en vue de détecter toute réaction anormale due à ce stock semence.

b) Méthode de culture

Le stock principal de semence doit être préparé et conservé à une température inférieure ou égale à -70 °C. Des sub-cultures de ce stock sont utilisées pour la fabrication. La réplication virale est contrôlée par titrage pendant la réplication du virus.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Avant qu'un vaccin soit agréé, la preuve de l'efficacité du produit doit être établie par épreuve d'animaux vaccinés et témoins et pour chaque espèce cible. L'épreuve doit être effectuée à la fin de la période de durée d'immunité revendiquée par le fabricant. La cinétique des anticorps est aussi suivie de façon à établir une corrélation entre le titre d'anticorps sériques et la résistance à l'épreuve.

L'efficacité des vaccins produits est établie par des études sur chaque espèce cible vaccinée comme il est recommandé. Le niveau de protection à la fin de la période d'immunité est évalué par mesure des anticorps neutralisants spécifiques et par épreuve avec un virus rabique. Les conditions expérimentales de cette épreuve doivent reproduire les conditions naturelles de l'infection. La souche du virus d'épreuve doit de préférence avoir été isolée localement. Chez des animaux vaccinés avec un virus inactivé, le pourcentage de séroconversion et le niveau moyen des anticorps permettent une bonne estimation de la survie à l'épreuve (3).

La corrélation entre l'efficacité sur l'espèce cible et la valeur antigénique telle qu'elle est estimée sur souris doit être établie (voir section C.4.c. plus bas).

En vue de leur agrément, l'innocuité des vaccins doit être vérifiée sur espèces cibles. Dans le cas de vaccins à virus vivants utilisés pour les campagnes de vaccination orale (y compris avec des vaccins recombinants), les tests d'innocuité doivent aussi être effectués sur les espèces vivant dans la zone de vaccination et qui peuvent se trouver exposées au vaccin (6).

La stabilité du vaccin est établie en testant des lots après stockage prolongé, en général 1 à 2 ans. Un processus de vieillissement accéléré par stockage une semaine à 37 °C est parfois utilisé. La durée de conservation du vaccin revendiquée par le producteur est contrôlée par les autorités d'agrément nationales. En général, elle est de 12 à 18 mois pour les vaccins liquides et peut éventuellement atteindre 24 mois pour les vaccins lyophilisés.

2. Méthode de fabrication

Quelle que soit la méthode adoptée, une attention particulière doit être portée à la qualité du substrat. Les œufs doivent être indemnes d'organismes pathogènes spécifiques, les cultures cellulaires telles que des lignées de BHK, doivent être conformes aux exigences internationales de stérilité et d'innocuité.

Pendant la fabrication, la réplication du virus sur un des substrats mentionné plus haut est contrôlée pour effectuer la récolte au moment le plus approprié, d'habitude 4 à 6 jours après inoculation des œufs ou des cultures cellulaires. La récolte virale est mise en suspension dans une solution tampon à la dilution qui va donner un pouvoir antigénique optimal au produit final. Si nécessaire, la suspension est inactivée ou lyophilisée. Un

adjuvant est recommandé pour les vaccins préparés à partir de virus inactivé, comme pour les vaccins multivalents.

a) En cultures cellulaires

Les cellules sont infectées avec des souches de virus rabique adaptées à la culture cellulaire et incubées entre 35 et 36 °C. La récolte peut ensuite être utilisée dans des vaccins à virus vivants (vaccins Flury et SAD) ou pour produire des vaccins à virus inactivés après ajout de phénol (vaccin Semple) ou d'autres produits chimiques telles que la bêta-propiolactone.

La culture cellulaire peut aussi être utilisée pour cultiver des virus vecteurs (comme le virus de la vaccine) qui expriment le gène codant la glycoprotéine du virus rabique (31).

b) Sur œufs

Une souche adaptée par passage sur œufs est inoculée sur des œufs embryonnés EOPS qui sont ensuite incubés 5 à 6 jours à 38 °C. Le virus est le plus souvent récolté sous forme de tissus embryonnaires infectés, et est généralement lyophilisé et utilisé comme un vaccin vivant. De tels exemples de vaccins comprennent la souche Flury à nombre réduit de passages sur œufs (LEP) et la souche Flury à passages élevés sur œufs (HEP) qui est bien préférable car beaucoup plus sûre chez les espèces animales telles que le chat.

c) Sur animaux

Les vaccins préparés à partir de tissus nerveux ne sont plus considérés comme efficaces et sans danger, et ne doivent plus être utilisés.

3. Contrôle en cours de fabrication

Cela consiste à suivre la réplication du virus pour obtenir un titre optimal et à s'assurer de l'absence de contamination microbienne indésirable.

Pour les vaccins à virus vivants, la cinétique de multiplication du virus doit être établie de façon à obtenir un titre final du virus qui corresponde à la protection désirée chez l'espèce cible.

Pour les vaccins à virus inactivés, les propriétés immunogènes du produit final peuvent être évaluées par des épreuves *in vitro* (ELISA, immunodiffusion en gel, épreuve de liaison des anticorps ou coloration des cellules infectées). Ces évaluations indiquent le meilleur moment de récolte du virus sur les cultures cellulaires.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Les tests de contrôle de stérilité et d'absence de contamination des matériels biologiques peuvent être trouvés au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Les tests d'innocuité des lots de vaccin à virus inactivé sont effectués par inoculation de culture cellulaire ou de souris par voie intracérébrale pour mettre en évidence des virus viables. Pour les vaccins à virus vivant, un test d'innocuité doit être effectué sur chaque lot de vaccin sur espèce cible. Au moins trois, et de préférence cinq à six animaux de l'espèce cible reçoivent une dose équivalente à 10 fois la dose recommandée pour l'utilisation du produit par la voie d'administration classique du produit. Les animaux sont observés 180 jours pour mettre en évidence tout effet indésirable éventuel lié au vaccin (23).

c) Activité

La quantité de virus présente dans les vaccins à virus vivants atténués et les vaccins recombinants est déterminée par titrage. Une fois que la corrélation a été établie entre l'activité du vaccin sur l'espèce cible et le titre viral, le titrage de virus devient un indicateur fiable d'efficacité du vaccin. Cela est effectué sur cultures cellulaires ou par inoculation intracérébrale à des souriceaux nouveau-nés (chez la souris, cela n'est possible que pour quelques virus atténués). Les vaccins recombinants devraient être testés pour l'expression de la protéine rabique jusqu'à ce que la stabilité de cette expression soit assurée tout au long du processus de fabrication. Le titre du virus vecteur peut alors être utilisé comme un indicateur fiable de l'efficacité du vaccin.

Pour des vaccins à virus inactivés, la corrélation entre l'activité pour l'espèce cible et la valeur antigénique déterminée sur la souris est un indicateur fiable de l'activité du vaccin. L'efficacité du vaccin est établie aux États-Unis d'Amérique par le test des NIH (National Institutes of Health). Ailleurs, le test de la Pharmacopée Européenne est largement adopté.

Des groupes d'au moins 10 souris, âgées de 3 à 4 semaines, sont vaccinés une fois avec des doses décroissantes du vaccin selon la Pharmacopée Européenne (23), ou avec 2 doses à une semaine d'intervalle, selon le test des NIH (45). Un nombre suffisant de dilutions de vaccins est comparé pour estimer la dilution à laquelle 50 % des souris sont protégées contre une épreuve intracérébrale 14 jours plus tard (23, 45).

Un vaccin étalon international de l'OMS est disponible (voir note de bas de page 2) pour calibrage des étalons nationaux, de telle façon que les résultats des tests de pouvoir antigène puissent être exprimés en unités internationales. Le test n'est valide que si :

- i) Pour le vaccin à tester et la préparation de référence, la dilution protégeant 50 % des souris est située entre la plus faible et la plus forte dilution du vaccin.
- ii) Le titrage du virus d'épreuve montre que dans 0,03 ml de suspension contenait 25 DL₅₀ intra-cérébrale pour la souris (DL₅₀IC/souris). La dose d'épreuve doit se situer entre 12 et 50 DL₅₀IC/souris pour que le test soit validé.
- iii) L'intervalle de confiance ($p = 0,95$) pour le test ne doit pas être inférieur à 25 % ni supérieur à 400 % de l'efficacité estimée : les analyses statistiques doivent montrer une courbe et une pente significative et aucune déviation significative en linéarité ou en parallélisme dans les corrélations dose-réponses.

Le vaccin réussit l'épreuve si son activité mesurée n'est pas inférieure à 1 UI par dose, avec la plus faible dose prescrite.

Un test simplifié peut aussi être utilisé pour trier quels vaccins sont susceptibles d'avoir une valeur antigénique ≥ 1 UI par dose (4). Ce test utilisé comme épreuve de criblage est un bon moyen de réduire le nombre de souris utilisées dans les tests de contrôle de l'activité des vaccins.

d) Durée de l'immunité

Pour l'agrément du vaccin, la durée de l'immunité doit être établie sur les espèces cibles avec un protocole de vaccination défini.

e) Stabilité

La durée de conservation proposée doit être vérifiée par des tests appropriés. Ces expérimentations comprennent des tests de stabilité biologique et physico-chimiques et doivent être effectués sur un nombre suffisant de lots de vaccins conservés dans les conditions recommandées.

La thermostabilité des vaccins à virus vivants présentés sous forme liquide est en général faible. Les vaccins à virus inactivés lyophilisés, ont généralement une stabilité de 2 ans à 4 °C.

f) Agents de conservation

Les vaccins à virus inactivés contiennent des agents de conservation (formol, merthiolate). La nature et la quantité de ces agents de conservation doivent répondre aux exigences des réglementations nationales.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir section C.4.b.

b) Activité

Voir section C.4.c.

6. Vaccination orale

Le concept de vaccination par voie orale est unique : étant donné que les animaux errants ou sauvages restent hors d'atteinte, la seule façon de les immuniser est de déposer les vaccins sur leur territoire. Dans les années

1980 et 1990, le département de Santé Publique Vétérinaire de l'OMS a organisé plusieurs réunions d'experts de la rage pour définir les exigences concernant l'innocuité et l'efficacité des vaccins tant pour les espèces cibles (renards roux, chiens viverrins, mouffettes, chien domestiques etc.) que pour les espèces non cibles, notamment les rongeurs sauvages et tous autres animaux domestiques ou sauvages susceptibles d'entrer en contact avec des appâts ou des animaux récemment vaccinés (42, 44).

Plusieurs lignes directrices ont été établies concernant les critères de qualité que doivent remplir les vaccins avant leur mise sur le marché, les documents les plus élaborés étant publiés par l'OMS, la Pharmacopée Européenne et la Commission Européenne (24, 25, 44). Les vaccins destinés à l'administration par voie orale ont été maintes fois testés par différentes voies (cérébrale, musculaire et orale) chez de nombreuses espèces : carnivores jeunes et adultes, oiseaux, primates non humains, rongeurs et souris immunodéficientes. Les primates non humains ont été ajoutés à cette liste après qu'on ait découvert, en 1992, que la souche SAD Bern originale était hautement pathogène par voie orale pour les babouins (12).

Tous les vaccins actuellement utilisés dans les programmes de vaccination orale sont soit des virus vivants modifiés soit des vaccins recombinants vivants. Deux vaccins sont aujourd'hui recommandés par l'OMS (44) : un vaccin recombinant - le VRG, et un vaccin à virus hautement atténué - le SAG2.

Leurs contrôles de production sont très proches de ceux utilisés pour les vaccins utilisés par voie parentérale. Les principales différences portent sur trois points :

- i) Innocuité du vaccin pour l'homme ainsi que pour les espèces cibles et non cibles
- ii) Efficacité de la protection conférée par le vaccin
- iii) Suivi de l'impact des campagnes de vaccination orale sur le terrain

a) Étude de l'innocuité

La vaccination orale peut être réalisée soit avec des souches de virus rabique atténuées soit avec des vaccins recombinants vivants. Leur usage ne doit entraîner aucun effet indésirable chez les espèces cibles et non cibles. Dans le cas des vaccins destinés aux chiens il faut vérifier que la salive des animaux vaccinés ne contienne aucun virus vaccinal, du fait d'un contact possible de ces animaux avec l'homme.

Les vaccins à base de virus atténués doivent présenter la plus faible pathogénicité résiduelle possible pour les espèces cibles et non cibles (24) ; c'est d'une importance cruciale en cas de vaccination orale des chiens, car ces derniers sont souvent en contact étroit avec l'homme (44).

Les vaccins recombinants ne peuvent entraîner aucun risque de rage ; les contrôles d'innocuité ne concernent donc que la pathogénicité résiduelle éventuelle du virus parental recombinant.

b) Protection conférée par le vaccin

La vérification de la protection conférée par le vaccin doit concerner non seulement le virus lui-même (pour déterminer la dose vaccinale minimale) mais également la protection conférée par l'appât fabriqué industriellement et prêt à l'emploi sur le terrain. C'est ainsi que, dans le cas des renards, le vaccin doit avoir un titre minimum égal à au moins dix fois celui de la dose protégeant 100 % des animaux préalablement déterminée par dépôt direct du même vaccin dans la gueule de l'animal (14).

L'immunité ne peut être vérifiée par la seule recherche d'anticorps sériques ; une épreuve virulente réalisée avec une souche homologue de virus sauvage par rapport à la souche vaccinale est nécessaire, du fait du rôle important que joue la réponse immunitaire à médiation cellulaire dans la vaccination orale (25).

c) Suivi de l'impact de la vaccination orale

La stabilité du vaccin sur le terrain est un point important. La Commission européenne a bien souligné la nécessité de vérifier que le vaccin protège toujours à 100 %, même après être resté exposé 7 jours à 25 °C (24). La stabilité de chaque appât-vaccin doit être vérifiée. Il ne doit pas fondre à moins de 40 °C et la capsule ou le sachet plastique contenant le vaccin doit rester enrobée dans l'appât après 7 jours d'exposition à 40 °C (24). Le largage des appâts à partir d'un aéronef est la seule façon de réaliser une distribution régulière, rapide et suffisante des appâts-vaccin destinés aux animaux sauvages. Des contrôles minima de qualité doivent être mis en place pour suivre en permanence les différents points-clés de cette distribution : contrôle du titre vaccinal, contrôle de la couverture vaccinale aérienne et densité de la distribution des appâts. Une coopération transfrontalière entre pays voisins est également nécessaire pour éviter que des zones restent sans couverture vaccinale le long des frontières. En Europe, deux campagnes de vaccination orale sont organisées chaque année. Au printemps, elle vise à vacciner les jeunes de l'espèce cible, à des dates dépendantes de la biologie de cette espèce. En automne, la campagne concerne à la fois les jeunes

et les adultes. On admet généralement que quatre campagnes (soit deux ans de vaccination) doivent être organisées après la découverte du dernier cas de rage.

L'impact de la vaccination sur la population hôte/vecteur est suivi de deux façons différentes :

- Directement, en évaluant la prise d'appâts par les espèces sauvages cibles. Cela suppose qu'un biomarqueur (généralement de la tétracycline) soit incorporé dans l'enrobage de l'appât, et ses traces seront retrouvées dans les os ou les dents de l'animal mort. Cet examen permet de déterminer l'âge de l'animal par la même occasion.
- Directement, en mesurant le taux d'anticorps sériques chez les animaux cibles. Les meilleures méthodes pour ce faire sont les techniques immuno-enzymatiques validées (22, 35) car elles sont plus robustes que les techniques de séro-neutralisation virale en cas de prélèvements de terrain de mauvaise qualité.
- Indirectement, en déterminant l'incidence de la rage dans les zones vaccinées. Les virus isolés sur le terrain seront typés (44) soit par des anticorps monoclonaux soit par séquençage des prélèvements positifs provenant de régions où les espèces cibles ont été vaccinées avec des vaccins à virus atténués, ce qui permet éventuellement de distinguer les souches vaccinales des souches sauvages.

Les deux premiers contrôles seront réalisés sur des animaux tués dans le but exprès d'effectuer des prélèvements de bonne qualité. Le suivi de la rage est plus précis lorsqu'il est réalisé sur des animaux morts ou malades.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AUBERT M.F.A. (1982). Sensibilité et fidélité du diagnostic de rage au laboratoire. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **5**, 369–376.
2. AUBERT M.F.A. (1982). Une méthode simple de calcul des titres des suspensions virales, vaccinales ou séroneutralisantes: la méthode graphique. (A simple method for calculating titres of virus, vaccine or serum-neutralising suspensions: the graphic method.) *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **1**, 828–833.
3. AUBERT M.F.A. (1992). Practical significance of rabies antibodies in cats and dogs. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **11**, 735–760.
4. AUBERT M.F.A. & BLANCOU J. (1982). Test simplifié de contrôle d'activité des vaccins antirabiques à virus inactivés. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **1**, 811–822.
5. BADRANE H., BAHLOUL C., PERRIN P. & TORDO N. (2001). Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J. Virol.*, **75**, 3268–3276.
6. BAER G.M. (1991). The Natural History of Rabies, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 620 pp.
7. BARNARD B.J.H. & VOGES S.F. (1982). A simple technique for the diagnosis of rabies in formalin-preserved brain. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **49**, 193–194.
8. BARRAT J. (1992). Experimental diagnosis of rabies. Adaptations to field and tropical conditions. Proceedings of the International Conference on Epidemiology, Control and Prevention of Rabies in Eastern and Southern Africa. Lusaka, Zambia, 2–5 June 1992, 72–83.
9. BARRAT J. & AUBERT M.F.A. (1995). Diagnostic de la rage animale en France de 1991 à 1993, bilan de CNEVA laboratoire d'études sur la rage et la pathologie des animaux sauvages en France. *Revue Méd. Vét.*, **146**, 561–566.
10. BARRAT J., BARRAT M.J., PICARD M. & AUBERT M.F.A. (1986). Diagnostic de la rage sur culture cellulaire, comparaison des résultats de l'inoculation au neuroblastome murin et de l'inoculation à la souris. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **11**, 207–214.
11. BARRAT J. & BLANCOU J. (1988). Technique simplifiée de prélèvement, de conditionnement et d'expédition de matière cérébrale pour le diagnostic de rage. *Doc. WHO/Rab. Res./88.27*.

12. BINGHAM J., FOGGIN C.M., GERBER H., HILL F.W.G., KAPPELER A., KING A., PERRY B.D. & WANDELER A. (1992). Pathogenicity of SAD vaccine rabies vaccine given orally in Chacma baboons (*Papio ursinus*). *Vet. Rec.*, **131**, 55–56.
13. BINGHAM J. & VAN DER MERWE M. (2002). Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *J. Virol. Methods*, **101**, 85–94.
14. BLANCOU J., SCHNEIDER L.G., WANDELER A. & PASTORET P.P. (1986). Vaccination du renard roux (*Vulpes vulpes*) contre la rage par voie orale. Bilan d'essais en station expérimentale. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, **40**, 249–255.
15. BLANCOU J., SORIA BALTAZAR R., MOLLI I. & STOLTZ J.F. (1991). Effective postexposure treatment of rabies-infected sheep with rabies immune globulin and vaccine. *Vaccine*, **9**, 432–437.
16. BOURHY H., KISSI B. & TORDO N. (1993). Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology*, **194**, 70–81.
17. BOURHY H. & SUREAU P. (1991). Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la rage; Metodos de laboratorio para el diagnostics de la rabia; Laboratory methods for rabies diagnosis. Commission des Laboratoires de référence et d'Expertise de l'Institut Pasteur, Paris, France, 197 pp.
18. BRIGGS D.J., SMITH J.S., MUELLER F.L., SCHWENKE J., DAVIS R.D., GORDON C.R., SCHWEITZER K., ORCIARI L.A., YAGER P.A. & RUPPRECHT C.E. (1998). A comparison of two serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cats being exported to rabies-free areas. *Biologicals*, **26**, 347–355.
19. BROCHIER B., KIENY M.P., COSTY F., COPPENS P., BAUDUIN B., LECOCQ J.P., LANGUET B., CHAPPUIS G., DESMETTRE P., AFIADEMANYO K., LIBOIS R. & PASTORET P.-P. (1991). Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature*, **354**, 520–522.
20. BROOKES S.M., PARSONS G., JOHNSON N., MCELHINNEY L.M. & FOOKS A.R. (2005). Rabies human diploid cell vaccine elicits cross-neutralising and cross-protecting immune responses against European and Australian bat lyssaviruses. *Vaccine*, **23**, 4101–4109.
21. CLIQUET F., AUBERT M. & SAGNE L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods*, **212**, 79–87.
22. CLIQUET F., SAGNE L., SCHEREFFER J.L. & AUBERT M.F.A. (2000). ELISA tests for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine*, **18**, 3272–3279.
23. COUNCIL OF EUROPE (2005). Vaccinum rabiei perorale vivum ad vulpen. Rabies vaccine (live, oral) for foxes. European Pharmacopeia, Fifth Edition. Monograph 074663. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 792.
24. EUROPEAN COMMISSION (2002). The oral vaccination of foxes against rabies. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, adopted 23 October 2002. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Directorate C – Scientific Opinions, C2 – Management of Scientific Committees; Scientific Co-Operation and Networks, 55 pages.
25. EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES (2007). Rabies Vaccine (live, oral) for foxes (2007). European Pharmacopoeia 06, 01: 952–953.
26. FEKADU M., SHADDOCK J.H., SANDERLIN D.W. & SMITH J.S. (1988). Efficacy of rabies vaccines against Duvenhage virus isolated from European house bats (*Eptesicus serotinus*), classic rabies virus and rabies-related viruses. *Vaccine*, **6**, 533–539.
27. GENOVESE M.A. & ANDRAL L. (1978). Comparaison de deux techniques utilisées pour le diagnostic de la rage: l'immunofluorescence et l'immunoperoxydase. *Rec. Med. Vet.*, **154** (7–8), 667–671.
28. GOLDWASSER R.A. & KISSLING R.E. (1958). Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **98**, 219–223.
29. HANLON C.A., KUZMIN I.V., BLANTON J.D., WELDON W.C., MANANGAN J.S. & RUPPRECHT C.E. (2005). Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus Res.*, **111**, 44–54.

30. HOOPER P.T., LUNT R.A., GOULD A.R., SAMARATUNGA H., HYATT A.D., GLEESON L.J., RODWELL B.J., RUPPRECHT C.E., SMITH J.S. & MURRAY P.K. (1997). A new lyssavirus – the first endemic rabies-related virus recognised in Australia. *Bull. Inst. Pasteur*, **95**, 209–218.
31. KIENY M.P., LATHE R., DRILLIEN R., SPEHNER D., SKORY S., SCHMITT D., WIKTOR T., KOPROWSKI H. & LECOCQ J.P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*, **312**, 163–166.
32. MONTANO HIROSE J.A., BOURHY H. & SUREAU P. (1991). Retro-orbital route for brain specimen collection for rabies diagnosis. *Vet. Rec.*, **129**, 291–292.
33. PERRIN P., LAFON M., VERSMISSE P. & SUREAU P. (1985). Application d'une méthode immunoenzymatique au titrage des anticorps antirabiques neutralisants en cultures cellulaires. *J. Biol. Stand.*, **13**, 35–42.
34. RUDD R.J. & TRIMACHI C.V. (1987). Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 145–168.
35. SERVAT A., FEYSSAGUET M., BLANCHARD I., MORIZE J.L., SCHEREFFER J.L., BOUÉ F. & CLIQUET F. (2007). A quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores. *J. Immunol. Methods*, **318**, 1–10.
36. SMITH J.S., YAGER P.A. & BAER G.C. (1973). A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. WHO*, **48**, 535–541.
37. VON TEICHMAN B.F., DE KOKER W.C., BOSCH S.J., BISHOP G.C., MERIDITH C.D. & BINGHAM J. (1998). Mokola virus infection: description of recent south African cases and a review of the virus epidemiology. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **69**, 169–171.
38. UMOH J.U. & BLENDEN D.C. (1981). Immunofluorescent staining of rabies virus antigen in formalin fixed tissue after treatment with trypsin. *Bull. WHO*, **59**, 737–744.
39. WARNER C.K., WHITFIELD S.G., FEKADU M. & HO H. (1997). Procedures for reproducible detection of rabies virus antigen mRNA and genome *in situ* in formalin-fixed tissues. *J. Virol. Methods*, **67**, 5–12.
40. WIKTOR T.J., DOHERTY P.C. & KOPROWSKI H. (1977). In vitro evidence of cell-mediated immunity after exposure of mice to both live and inactivated rabies virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **74**, 334–338.
41. WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDS. THIRTY-FIFTH REPORT (1985). World Health Organisation Technical Report Series No. 725. WHO, Geneva, Switzerland.
42. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1989). Report of WHO Consultation on requirements and criteria for field trials on oral rabies vaccination of dogs and wild carnivores, Geneva, 1–2 March 1989, *Doc. WHO/Rab.Res./89.32*.
43. WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON RABIES. EIGHTH REPORT (1992). World Health Organisation Technical Report Series No. 824, 84 pp.
44. WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON RABIES, FIRST REPORT (2005). World Health Organisation, WHO Technical Report Series, **931**, WHO, Geneva, Switzerland, 1–87.
45. WORLD HEALTH ORGANISATION (1996). Laboratory Techniques in Rabies, Fourth Edition, Meslin F.-X., Kaplan M.M. & Koprowski H., eds. WHO, Geneva, Switzerland.
46. XU G., WEBER P., HU Q., XUE H., AUDRY L., LI C., WU J. & BOURHY H. (2007). A simple sandwich ELISA (WELYSSA) for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens using mouse monoclonal antibodies. *Biologicals*, **35**, 297–302.
47. ZALAN E., WILSON C. & PUKITIS (1979). A microtest for quantitation of rabies virus. *J. Biol. Stand.*, **7**, 213–220.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la rage (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

FIÈVRE DE LA VALLÉE DU RIFT

RÉSUMÉ

La fièvre de la Vallée du Rift (FVR) est une zoonose aiguë ou suraiguë, affectant les ruminants domestiques d'Afrique. Elle est due à un virus appartenant à la famille des Bunyaviridés du genre Phlebovirus. Ce virus ne possède qu'un seul sérotype, il est transmis par les moustiques. La maladie se manifeste lorsque les conditions favorisent la multiplication des moustiques vecteurs du virus, elle se caractérise par des lésions hépatiques. Cette maladie affecte plus sévèrement les ovins, les caprins et les bovins, chez lesquels elle entraîne des avortements et un taux élevé de mortalité des nouveau-nés. Les animaux plus âgés et les femelles non-gravides sont également sensibles, mais il sont plus résistants à la maladie. Il existe une variation considérable de sensibilité vis-à-vis de la FVR selon la race de l'animal. Les races ou les lignées qui ne sont pas d'origine africaine, ou qui proviennent de régions où la FVR n'est pas enzootique, ont tendance à être plus sensibles. Les chameaux souffrent d'une infection inapparente, mais les taux d'avortement peuvent être aussi élevés que chez les bovins. Parmi les ruminants sauvages, les buffles peuvent avorter au cours d'une infection inapparente.

L'homme est sensible au virus et peut être infecté soit par contact avec du matériel contaminé, soit par des piqûres de moustiques. Cette transmission à l'homme est un trait caractéristique des pays où la population des animaux hôtes est réduite. Dans ces régions, c'est d'abord chez l'homme que la FVR peut être reconnue. De nombreuses personnes travaillant dans des laboratoires ont déjà été infectées par ce virus, il est donc impératif de manipuler tout matériel infecté avec la plus haute précaution. Il est recommandé de vacciner le personnel de laboratoire.

Identification de l'agent pathogène : *il n'existe qu'un seul sérotype du virus de la FVR ; c'est un bunyavirus du genre Phlebovirus, ses caractéristiques morphologiques et physicochimiques sont celles des bunyavirus.*

Le virus peut être isolé à partir de sang, prélevé de préférence sur un anti-coagulant, pendant la phase d'hyperthermie, ou à partir de prélèvements de foie, de rate, ou d'encéphale d'un animal mort, ou des organes d'un fœtus avorté. Les isolements primaires de virus s'effectuent habituellement sur différents types de cultures de cellules : cellules rénales de singe vervet d'Afrique (VERO), cellules rénales de hamster nouveau-né, cellules de reticulum d'embryon de poulet, ou cellules primaires d'origine ovine ou bovine. Une autre solution consiste à utiliser des hamsters, des souris adultes ou nouveau-nées, des œufs de poule embryonnés ou des agneaux âgés de 2 jours.

Un diagnostic rapide peut être effectué à l'aide des méthodes et des prélèvements suivants : surnageant de prélèvements homogénéisés utilisé en tant qu'antigène dans des épreuves de séroneutralisation virale (SN), coloration par immunofluorescence de décalques de foie, de rate, de cerveau ou de cultures de cellules infectées, mise en évidence de la présence du virus dans du sérum prélevé pendant la phase d'hyperthermie par méthode immuno-enzymatique ou par épreuve d'immunodiffusion.

La présence de lésions histopathologiques hépatiques caractéristiques renforce le diagnostic.

Épreuves sérologiques : *les animaux infectés produisent des anticorps spécifiques qui peuvent être mis en évidence par la méthode de SN 3 jours seulement après l'infection, et dans un délai de 6 à 7 jours par dosage immunoenzymatique, ou par inhibition de l'hémagglutination. Certaines*

épreuves sérologiques sont moins utilisées, il s'agit des épreuves d'immunofluorescence, de fixation du complément et d'immunodiffusion.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : les vaccins à virus vivant et les antigènes utilisés dans les pays où la FVR est enzootique ou lors d'une épizootie, devront être préparés à partir de virus de la FVR non-pathogènes pour la souris ou atténués par mutagenèse, multipliés en cultures cellulaires. L'usage de la souche mutagène atténuée de la FVR ne peut être encore recommandé.

Dans les pays indemnes de FVR, les vaccins et les épreuves de diagnostic ne doivent utiliser que des virus inactivés. Les souches appropriées de virus peuvent être obtenues auprès du Laboratoire de référence de l'OIE pour la FVR (se reporter à la liste de la partie 3 de ce Manuel terrestre).

A. INTRODUCTION

Le virus de la FVR consiste en un seul sérotype d'un bunyavirus du genre *Phlebovirus* ; il présente les propriétés morphologiques et physicochimiques caractéristiques des bunyavirus. Il est enveloppé et sphérique avec un diamètre de 80–120 nm. De courts spicules glycoprotéiques font saillie à travers les deux couches de l'enveloppe lipidique, et il est rapidement inactivé par les solvants de lipides et en conditions acides (pH < 6). Le génome du virus est constitué d'ARN divisé en trois segments mono-brins, à sens négatif. Les trois segments sont: L (pour large), M (pour medium) et S (pour small), chacun étant enfermé dans une nucléocapside séparée à l'intérieur du virion. Le segment S est constitué par de l'ARN ambisens, c'est-à-dire qu'il peut coder dans les deux directions (12).

La fièvre de la Vallée du Rift (FVR) est une zoonose aiguë ou suraiguë, transmise par les moustiques, due à un virus de la famille des *Bunyaviridae* du genre *Phlebovirus*. Elle est habituellement présente dans un pays sous la forme épizootique sur de grands espaces après de fortes pluies ou des inondations. Elle se caractérise par une hyperthermie, par des taux élevés d'avortement et de mortalité néonatale, elle affecte principalement les ovins, les caprins, et les bovins. Il existe des variations considérables de la sensibilité à la FVR selon la race de l'animal. L'infection chez certaines espèces animales d'origine africaine peut rester non-apparente, alors qu'elle peut se manifester par des signes cliniques sévères, comme la mort ou l'avortement, chez d'autres espèces, notamment les espèces qui ne sont pas d'origine africaine. Les animaux plus âgés non gestants et certaines autres espèces, bien qu'ils soient également sensibles, développent rarement des signes de la maladie. Les chameaux ont été régulièrement impliqués dans les épizooties de FVR en Afrique de l'Est et en Egypte. Les signes cliniques de la maladie ne sont pas visibles chez les chameaux adultes, mais l'avortement survient et quelques morts précoces en post-natal ont été observées.

Les signes de la maladie ont tendance à ne pas être pathognomoniques, ce qui rend les cas individuels difficiles à identifier (8-11, 13, 22, 34) ; néanmoins lors d'une épizootie, la maladie se caractérise par de nombreux avortements et une mortalité élevée chez les jeunes animaux, associés à des cas d'infection humaine. La FVR a une période d'incubation courte de 12 à 36 h par exemple chez l'agneau. Une hyperthermie biphasique pouvant atteindre 41 °C peut apparaître. La température reste élevée peu de temps avant la mort. Les animaux affectés sont apathiques et peu enclins à bouger et à manger. Les noeuds lymphatiques peuvent être hypertrophiés et on observe des douleurs abdominales. Les agneaux survivent rarement plus de 36 h après l'apparition des signes de la maladie. Les animaux âgés de plus de 2 semaines peuvent mourir d'une infection suraiguë ou aiguë, ou développer une infection non-apparente. Certains animaux peuvent régurgiter leur nourriture, avoir une diarrhée nauséabonde hémorragique ou noirâtre, ainsi que du jetage mucopurulent ou hémorragique. Un ictère est possible, surtout chez les bovins. Chez les bovins adultes, la maladie peut se manifester par d'autres signes : larmolements, hypersalivation, diminution de la sécrétion lactée. Chez les brebis gravides, selon les foyers et les troupeaux, les taux de mortalité et d'avortement varient de 5 % à presque 100 %. Le taux de mortalité chez les bovins reste la plupart du temps inférieur à 10 %.

Les lésions hépatiques dues à la FVR varient très peu d'une espèce à l'autre, et surtout en fonction de l'âge de l'animal infecté (9). La lésion la plus sévère affectant les foetus avortés et les agneaux nouveau-nés se caractérise par une augmentation du volume du foie qui est friable et mou. Une congestion hépatique en plaques irrégulières est aussi présente, associée à une modification de la couleur de l'organe qui devient brun-jaunâtre ou brun-rougeâtre. De nombreux foyers nécrotiques grisâtres sont toujours présents dans le parenchyme, mais peuvent être difficiles à distinguer. Chez les moutons adultes, les lésions sont moins sévères et des foyers nécrotiques ponctuels rougeâtres ou grisâtres sont répartis sur l'ensemble du parenchyme. Une hémorragie et un oedème de la paroi de la vésicule biliaire sont courants. Chez les agneaux, les lésions hépatiques s'accompagnent presque toujours de nombreux petits foyers hémorragiques au niveau de la muqueuse de la caillette. Le contenu de l'intestin grêle et de la caillette ont une couleur foncée brun-chocolat, due à la présence

de sang partiellement digéré. Chez tous les animaux, les noeuds lymphatiques périphériques sont tuméfiés, oedémateux, et présentent des pétéchies.

Microscopiquement, la nécrose hépatique est la lésion la plus évidente de la FVR à la fois chez les animaux et chez l'homme. Chez les foetus et les nouveaux-nés des bovins et des moutons, des foyers de nécrose sont constitués d'aggrégats denses de débris cellulaires et nucléaires, d'un peu de fibrine et de quelques cellules inflammatoires. Il y a une sévère nécrose lytique de la plupart des hépatocytes et l'architecture normale du foie est perdue. Dans environ 50 % des foies affectés, on retrouve des corps d'inclusion intra-nucléaires, éosinophiliques et de forme ovale ou de bâtonnet. Une minéralisation des hépatocytes nécrosés est également observée. Chez les animaux adultes, la nécrose hépatique est moins diffuse et chez les moutons, l'ictère est plus commun que chez les agneaux (32).

Chez les êtres humains, les infections par le virus de la FVR sont généralement non-apparentes ou sont associées à des symptômes grippaux modérés ou sévères, non-mortels (19, 21). Les lésions oculaires, les encéphalites, ou les hépatites hémorragiques généralement mortelles, se manifesteront seulement chez un petit nombre d'individus. De nombreuses personnes travaillant dans des laboratoires ont déjà été infectées gravement par ce virus. Aussi, le personnel doit, soit être vacciné et travailler dans des conditions de biosécurité de niveau 3, soit travailler dans des conditions de biosécurité de niveau 4, soit porter des masques de protection respiratoire. La manipulation d'animaux infectés et les autopsies doivent être effectuées avec des précautions particulières (se reporter au Chapitre 1.1.2., « La biosécurité au laboratoire de microbiologie vétérinaire »).

Aucune différence antigénique significative n'a été décelée entre les isolats de virus de la FVR et les souches obtenues par passages en laboratoire dans différents pays. En revanche, des différences de pouvoir pathogène ont été mis en évidence (5, 33).

L'infection d'êtres humains par des moustiques vecteurs est un trait caractéristique dans les pays tels que l'Égypte, qui comptent une population d'animaux hôtes réduite mais une population importante de moustiques.

La FVR survient habituellement sous forme d'épizooties en Afrique. Celles-ci peuvent impliquer en même temps plusieurs pays d'une région. Elles suivent les cycles de fortes pluies exceptionnelles, qui surviennent très rarement dans les zones semi-arides (cycle de 25-35 ans), et plus fréquemment (cycle de 5-15 ans) dans les prairies de la savane lors de la saison des fortes précipitations. Des taux faibles et indétectables d'activité du virus de la FVR peuvent survenir lors de périodes inter-épizootiques. Il convient de suspecter la FVR lorsque des avortements surviennent après des pluies abondantes et inhabituelles, et qu'ils s'accompagnent de cas mortels marqués par des nécroses et des hémorragies du foie affectant surtout les agneaux, les chevreaux et les veaux nouveau-nés, mais également de l'apparition de symptômes grippaux chez les ouvriers agricoles et les personnes ayant manipulé de la viande crue contaminée.

Des mesures préventives destinées à protéger le personnel contre une infection doivent être instaurées lorsqu'il doit manipuler des prélèvements de viande et de tissu suspects de FVR.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Le virus de la FVR peut être isolé à partir du serum ou du sang prélevé sur anti-coagulant au cours de la phase d'hyperthermie, du foie, de la rate, et de l'encéphale des animaux morts, ou des foetus avortés. L'isolement primaire est généralement effectué sur des hamsters, des souris nouveau-nés ou adultes, ou sur des cultures cellulaires de différents types.

a) Culture

L'isolement du virus doit être effectué à partir d'un volume d'environ 5 ml de sang prélevé au cours de la phase d'hyperthermie ou à partir d'environ 5 g de foie, de rate, ou de l'encéphale prélevés après la mort de l'animal. Le transport des prélèvements se fera à des températures comprises entre 0 et 4 °C. Si le transport au laboratoire doit prendre plus de 24 h, les échantillons doivent être congelés et envoyés sous glace carbonique. Environ 1 g de tissu homogénéisé est placé en suspension au 1/10 dans du milieu de culture cellulaire ou dans une solution tamponnée, de pH 7,5, contenant de la pénicilline sodique (1 000 Unités Internationales [UI]/ml), du sulfate de streptomycine (1 mg/ml), de la mycostatine (100 UI/ml), ou de la fongizone (2,5 µg/ml). La suspension est centrifugée à 1 000 **g** pendant 10 min, et le surnageant est injecté par voie intracérébrale à des souris âgées de 1 à 5 jours, ou par voie intrapéritonéale à des hamsters ou à des souris adultes. Les souris nouveau-nés mourront ou seront gravement malades 2 jours après l'infection. Les souris adultes seront affectées 1 à 3 jours plus tard. Bien que les souris et les hamsters

soient les animaux de laboratoire idéaux, il est également possible d'employer des agneaux ou des œufs de poule embryonnés.

Différentes monocouches cellulaires, comprenant les cellules rénales de singe vervet d'Afrique (VERO), les cellules de reticulum d'embryon de poulet (CER : cellules développées par Tsunemasa Motohashi à l'Institut japonais pour les sciences naturelles, Tokyo, Japon ; recaractérisées comme une lignée d'hamster) (4) et les cellules primaires de rein ou de testicule de veau et d'agneau, peuvent être ensemencées avec 1 ml de surnageant décanté du prélèvement. Elles sont ensuite incubées à 37 °C pendant 1 h. Il est recommandé d'inoculer également quelques cultures avec une dilution au 1/100 de l'inoculum. Ceci permet d'éviter la production de particules défectives, que l'on retrouve avec l'utilisation d'inoculum à fort titre viral. Il convient également de préparer des tubes de Leighton contenant des lamelles porte-objet. Les cultures sont lavées avec du PBS à température ambiante, puis recouvertes avec un milieu contenant 2 % de sérum sans anticorps de la FVR. Les cultures sont examinées quotidiennement au microscope, pendant 5 à 6 jours. Le virus de la FVR entraîne un effet cytopathogène (ECP) qui se caractérise par un léger arrondissement des cellules suivi par une destruction totale du tapis cellulaire dans un délai de 12 à 24 h. Une identification spécifique d'antigènes du virus de la FVR peut être effectuée dans un délai de 18 à 24 h après infection des préparations sur lamelles porte-objet grâce à la méthode de coloration par immunofluorescence.

La présence de virus peut également être mise en évidence par une épreuve d'immunofluorescence effectuée sur des frottis de foie, de rate et d'encéphale. Un diagnostic rapide est quelques fois possible, par la mise en évidence de l'antigène viral dans des tissus ou dans du sérum d'animaux en hyperthermie grâce au test de fixation du complément ou d'immunodiffusion en gélose (IDG). Un diagnostic rapide peut être effectué par détection de l'ARN viral en utilisant une réaction de transcription inverse couplée à une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR).

b) Immunodiffusion en gélose

L'IDG est utile pour les laboratoires qui ne sont pas équipés pour la culture cellulaire. Approximativement 1 g de tissu, préférentiellement du foie, est homogénéisé et préparé dans une suspension de 10 à 20 % de tampon borate salin, pH 9,0. Cette suspension est centrifugée à 1 000 *g* et le surnageant est utilisé dans l'épreuve. Des micro-IDG sont réalisées sur des lames paramétrées pour microscopie, couvertes avec 3 ml d'agarose à 1 % en tampon borate salin. Les empreintes de 6 puits périphériques et d'un puits central sont préparées et remplies avec des réactifs de la manière suivante : un positif, de préférence un sérum hyper-immun dans le puits central, un antigène utilisé comme témoin positif dans les puits 1 et 4, les tissus à tester dans les puits 2 et 5 et des tissus négatifs dans les puits 3 et 6. Une ligne de précipitation continue doit se former entre l'antigène témoin et le sérum positif. Elle s'étend pour inclure une ligne entre les tissus à testés et le sérum dans les cas positifs.

c) Réaction d'amplification en chaîne par polymérase

Un diagnostic rapide peut être effectué par détection de l'ARN viral (30) en utilisant une RT-PCR. La PCR a été utilisée, parmi d'autres techniques, pour la détection d'antigène dans deux épizooties récentes de FVR en Afrique – l'une au Kenya en 1998 et l'autre plus limitée en Afrique du Sud en 1999. Elle peut aussi être utilisée pour détecter le virus de la FVR dans des lots de moustiques (18). La RT-PCR, suivie du séquençage de la région codant la protéine NS (S) a été utilisée dans le cadre d'une analyse phylogénétique pour caractériser deux lignées distinctes de virus de la FVR – l'une égyptienne et l'autre sub-saharienne. Ceci fait de cette technique un outil puissant en épidémiologie moléculaire (29).

d) Histopathologie

L'examen histopathologique du foie d'animaux infectés révélera une cytopathologie caractéristique. L'immunomarquage permettra une identification spécifique d'antigène viral de la FVR dans les cellules infectées. Cette technique est un outil important du diagnostic car le foie ou les autres tissus peuvent être conservés dans du formol à des fins de diagnostic. Cela facilite la manipulation et le transport dans des régions éloignées du laboratoire.

2. Épreuves sérologiques

Les épreuves de séroneutralisation virale (SN), c'est à dire le test de microneutralisation, le test de neutralisation par réduction des plages (NRP) et le test de séroneutralisation sur souris, ont été utilisées pour déceler la présence d'anticorps vis-à-vis du virus de la FVR dans le sérum de beaucoup d'espèces. Les tests de séroneutralisation sont hautement spécifiques et fournissent les résultats les plus rapides, mais ils ne peuvent être mis en œuvre qu'avec un virus vivant. Il est donc déconseillé de les utiliser en dehors des régions d'enzootie ou dans des laboratoires sans installation de biosécurité appropriée et sans un personnel vacciné.

D'autres épreuves peuvent être réalisées : la méthode immuno-enzymatique (ELISA), l'inhibition de l'hémagglutination (IH), l'IDG, l'immunofluorescence, le dosage radio-immunologique et le test de fixation du complément. Cependant, des réactions croisées entre le virus de la FVR et d'autres phlébovirus peuvent apparaître avec ces épreuves. Ils présentent l'avantage toutefois de pouvoir être effectués avec de l'antigène inactivé, et donc de pouvoir être utilisés dans les pays indemnes de FVR.

L'ELISA est une épreuve fiable et sensible qui peut être employée chez plusieurs espèces pour détecter la présence d'anticorps anti-FVR (15). Un ELISA de capture des IgM permet le diagnostic d'une infection récente et peut être effectué à partir d'un échantillon de sérum unique.

L'épreuve d'IH peut être employée en toute confiance dans les régions non-enzootiques. Toutefois, les sérums provenant d'animaux ayant déjà été infectés par un phlébovirus autre que le virus de la FVR, peuvent réagir avec l'antigène de la FVR pour des titres allant jusqu'à 40, voire rarement jusqu'à 320 (33). On peut solliciter l'aide du Laboratoire de référence de l'OIE pour la FVR (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*) qui effectuera, pour des cas suspects, les épreuves de séroneutralisation spécifiques. Le titre d'anticorps IH après vaccination peut atteindre 640, voire 1 280. Les titres après infection naturelle seront eux, beaucoup plus élevés.

a) Séroneutralisation virale (épreuve prescrite pour le commerce international)

L'épreuve de SN peut être utilisée pour déterminer la présence d'anticorps chez des animaux naturellement infectés et chez des animaux vaccinés avec le vaccin de la FVR. L'épreuve est hautement spécifique et peut être utilisée pour tester des sérums de n'importe quelle espèce. Elle est généralement utilisée pour évaluer l'efficacité d'un vaccin. Des facteurs autres que les anticorps neutralisants peuvent jouer un rôle dans la résistance à la FVR. La souche *Smithburn*, souche hautement atténuée du virus de la FVR (31), à neurotropisme cérébral chez la souris, également reconnue comme virus vivant modifié et adapté à la culture cellulaire, est utilisée comme antigène. L'antigène est conservé à -80 °C ou à 4 °C sous forme lyophilisée. Le stock est titré pour déterminer la dilution donnant 100 DICT₅₀ (Dose infectant 50 % de la culture tissulaire) dans 25 µl et dans les conditions de l'épreuve.

• Protocole

- i) Inactiver les sérums à analyser pendant 30 min dans un bain-marie à 56 °C ;
- ii) Ajouter dans chacun des puits d'une microplaque à 96 puits, 25 µl de milieu de culture cellulaire, 5 % de sérum sans anticorps du virus de FVR et des antibiotiques ;
- iii) Ajouter 25 µl de sérum à analyser dans le premier puits de chaque rangée puis réaliser des dilutions de raison 2. Titrer chaque sérum en double, de 1/10 à 1/80, afin de les trier, ou en quadruplet, et à des dilutions plus élevées, afin de déterminer le titre final. Inclure des sérums témoins positifs et négatifs connus ;
- iv) Ajouter 25 µl d'antigène viral FVR (dilué en milieu de culture cellulaire et destiné à fournir 100 DICT₅₀ par puits) dans chaque puits contenant du sérum à tester dilué ainsi que dans les puits des rangées contenant les sérums témoins positif et négatif. Réaliser également des dilutions d'antigène de raison 2 dans au moins 2 rangées contenant uniquement du milieu de culture cellulaire ;
- v) Incuber pendant 30 min à 37 °C ;
- vi) Ajouter 50 µl de suspension de cellules VERO, CER ou de toutes autres cellules *ad hoc* à 3×10^5 cellules/ml, ou à une dilution connue, capable de produire une monocouche uniforme dans un délai de 12 h ;
- vii) Incuber les microplaques dans une atmosphère contenant 3 à 5 % de CO₂, pendant 3 à 5 jours ;
- viii) Examiner quotidiennement les monocouches à l'aide d'un microscope inversé, à la recherche d'un ECP. Les rangées contenant le sérum témoin positif ne doivent présenter aucun ECP. En revanche, l'ECP sera évident dans les rangées contenant le sérum témoin négatif et indiquera la présence de virus. Les résultats sont calculés par la méthode de Spearman-Kärber.

b) Méthode immuno-enzymatique

Pour le diagnostic sérologique de la FVR, plusieurs tests ELISA différents ont été publiés et sont disponibles dans le commerce (1, 28). Les antigènes à base de virus complet ou de foie de souris inactivés ont été remplacés par des antigènes à base de protéine de la nucléocapside (N) recombinante.

À l'heure actuelle, ces ELISA sont en format indirect et, en plus des considérations de sécurité très importantes, ils ont les avantages d'une bonne stabilité de l'antigène et de permettre de tester 40 sérums en double par plaque au lieu de seulement 20.

Un test ELISA indirect utilisant des plaques pré-sensibilisées avec une protéine de la nucléocapside (NC) recombinante et un conjugué peroxydase Protéine G est décrit ci-dessous (17).

- **Protocole**

Sauf indication contraire, toutes les dilutions sont faites avec un tampon à 10 % de lait déshydraté (v/v), et tous les lavages sont effectués 3 fois avec des volumes de 250-300 µl/puits.

- En utilisant les plaques pré-sensibilisées, ajouter 50 µl/puits de sérum dilué (1/100) à tester dans deux puits ;
- Ajouter le sérum témoin à une dilution prédéterminée dans deux puits. Incuber 1 h à 37 °C. Laver la plaque ;
- Ajouter le conjugué protéine G/peroxydase à la dilution de travail à tous les puits de la plaque. Incuber pendant 1 h à 37 °C. Laver la plaque ;
- Ajouter 50 µl de la solution prête-à-l'emploi de substrat TMB (Tetramethyl benzidine) à tous les puits. Couvrir la plaque et incuber à la température ambiante et à l'obscurité pendant 20 à 30 min ;
- Ajouter 50 µl de la solution d'arrêt prête-à-l'emploi dans tous les puits de la plaque. Tapoter doucement la plaque pour assurer un bon mélange du contenu. Attendre 5 min et lire la plaque à une densité optique de 450 nm ;
- Le plan d'une plaque est le suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC	TC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B	TC	TC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C	C++	C++	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
D	C++	C++	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
E	C+	C+	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
F	C+	C+	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
G	C-	C-	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
H	C-	C-	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40

TC : Témoin conjugué ; C++ : Témoin sérum fortement positif ; C+ : témoin sérum faiblement positif ;
C- : témoin sérum négatif ; 1-40: échantillons à tester.

De nouveaux tests ELISA sont proposés, notamment certains qui sont plus spécifiques pour les IgG et IgM (27).

c) Inhibition de l'hémagglutination

L'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination (IH) adaptée à une microtechnique est basée sur les travaux de Clarke et Casals (7). Un antigène extrait de foie de hamster en sucrose/acétone est utilisé dans une microplaque de 96 puits à fond en « U » et l'antigène est dilué tel que 4 unités hémagglutinantes soient utilisées dans l'épreuve. Les inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutinine sont éliminés par une extraction au kaolin des sérums suivie d'une adsorption avec des hématies d'oie avant d'être testés. Des dilutions doubles de sérum effectuées en tampon borate salin, pH 9, sont testées contre des volumes égaux d'antigène. Les plaques sont maintenues toute la nuit à 4 °C avant l'addition de 50 µl d'hématies à 0,5 % dans chaque puits. Les plaques sont lues après 30 min à température ambiante et les limites sont enregistrées comme la réciproque de la dilution de sérum la plus élevée donnant une inhibition complète de l'hémagglutination.

Des sérum témoins positifs et négatifs sont incorporés à chaque épreuve. L'épreuve est validée si les sérums témoins donnent les résultats attendus. Les sérums dont le titre est inférieur à 1/40 sont considérés comme négatifs.

Bien qu'elle ne soit pas spécifique, l'IH est appropriée pour les épreuves de dépistages. Des réactions croisées marquées se produisent entre les phlébovirus, mais les titres homologues dépassent les titres hétérologues. Expérimentalement, les phlébovirus africains autres que le virus de la FVR ne sont pas pathogènes pour les ruminants, et il est peu probable que les anticorps qu'ils induisent soient responsables de confusion dans le diagnostic du virus de la FVR (33).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Un vaccin à virus vivant préparé à partir de la souche atténuée de *Smithburn* du virus de la FVR a été utilisé dans le cadre de la lutte contre la FVR chez les bovins et les moutons non gestants dans les régions d'enzootie et lors de l'apparition de foyers (6). En revanche, les vaccins à virus inactivé utilisés sur les femelles gravides et dans les pays indemnes de FVR sont préparés à partir de souches virulentes obtenues sur le terrain (2, 3). Les vaccins à virus inactivé doivent être préparés à partir de souches de virus de la FVR hautement immunogènes produites en culture cellulaire. Le virus doit être inactivé par le formol et mélangé à un adjuvant augmentant l'immunogénicité. Le vaccin inactivé doit être testé avec précaution quant à son innocuité pour être certain qu'il ne reste pas de virus vivant.

Des lignes directrices pour la production de vaccins vétérinaires sont données au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont volontairement générales et doivent être complétées par les exigences nationales et régionales.

Chez l'homme, on a utilisé pendant 25 années avec beaucoup de succès un vaccin expérimental de la FVR à virus inactivé pour protéger les personnes exposées à des risques de contamination. Il est actuellement produit sur cellules diploïdes. Toutefois, les quantités de ce vaccin sont limitées et son usage ne peut donc être étendu à l'ensemble de la population.

Deux nouveaux vaccins potentiels produits à partir d'isolats humains de virus de FVR sont actuellement testés extensivement dans le but de remplacer les vaccins existants.

Le premier, MV P12, est obtenu par mutagenèse d'une souche de virus cultivée en présence de 5-fluorouracil avec des mutagenèses en série donnant une souche atténuée pour la souris. L'immunogénicité et la pathogénicité ont été testées chez le mouton et le virus n'a pas provoqué d'avortement chez les brebis gestantes (23). MVP12 a induit une protection chez l'agneau (14, 20) et le bovin (24, 25). Lors de tests ultérieurs chez les brebis, le vaccin, utilisé après 28 jours de gestation (c'est-à-dire au cours du premier trimestre), a provoqué l'avortement et un effet tératogène fœtal sévère (16).

Le second candidat, le Clone 13, un variant qui n'a pas réagi avec 2 anticorps monoclonaux spécifiques, s'est montré non-virulent chez la souris et le hamster et hautement immunogène. L'immunogénicité et la pathogénicité ont été testées chez l'agneau, le mouton, les chèvres adultes et les jeunes (26). Dans d'autres tests d'épreuve, il n'a pas provoqué d'avortement chez la brebis gestante et a donné plus de 80 % de protection lors de l'épreuve de virulence (15). Le Clone 13 possède une délétion importante dans la portion du segment d'ARNs codant les protéines non-structurales, ce qui devrait engendrer un vaccin candidat stable.

Dans la description suivante de la production de vaccin, une information est donnée sur la production de vaccins vivants suivie d'informations sur la production de vaccins inactivés. Il faut insister sur le fait que les vaccins vivants et les vaccins inactivés ne doivent jamais être produits dans les mêmes installations au même moment en raison d'un risque de contamination des vaccins atténués vivants par une souche virulente du virus avant qu'il ne soit inactivé. Le personnel manipulant du virus de la FVR vivant doit être vacciné et travailler dans un niveau 3 de confinement pour minimiser le risque d'infection.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Vaccin à virus vivant : le stock d'antigène est obtenu à partir de la souche neurotrope originale de *Smithburn*. Cette souche ne tue pas les souris adultes par voie intrapéritonéale. Elle est sans danger pour toutes les races de bovins, d'ovins et de caprins. Toutefois, elle est susceptible d'entraîner des malformations chez le fœtus et des avortements chez les femelles gravides.

Vaccin à virus inactivé : Pour la semence virale, il doit être utilisé une souche fortement immunogénique de la FVR, adaptée à la multiplication sur culture cellulaire. Cette souche diffère de celle atténuée en ce qu'elle est léthale lorsqu'elle est injectée par voie intrapéritonéale à la souris adulte.

b) Méthodes de culture

Les souches de virus atténué et les souches de virus vivant sont toutes deux obtenues sur cultures de cellules BHK, VERO ou CER. Les virus sont conservés sous forme lyophilisée dans des ampoules contenant 1 ml de suspension de culture cellulaire. Le titre minimum en virus (après une inoculation intra-cérébrale à une jeune souris) doit être de $10^{6.5}$ DL₅₀ (Dose Létale 50 %) par ml, pour la souris.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Le virus de semence doit être dépourvu de tout agent contaminant, il doit être inoffensif et procurer une immunité efficace aux espèces et aux races auxquelles il est destiné.

• Tests

On reconstitue le virus de semence lyophilisé dans un milieu de culture cellulaire stérile et dépourvu d'antibiotiques. On effectue ensuite des tests pour s'assurer qu'il n'a subi aucune contamination bactérienne ni fongique. Le contenu d'une ampoule de virus reconstitué est introduit dans 2 tubes contenant du thioglycollate et dans 2 tubes contenant de l'hydrolysate de caséine de soja. Les cultures en thioglycollate sont incubées à 37 °C pendant 7 jours, alors que les cultures en hydrolysate de caséine de soja sont incubées à 20 °C pendant 14 jours. Les cultures ne doivent présenter aucun ECP.

D'autre part, on mélange 5 ml de virus de semence reconstitué dans le même volume d'antisérum spécifique de la FVR obtenu sur lapins. Le mélange sérum/virus est incubé à 37 °C pendant 30 min, puis on effectue des tests sur les suspensions virales avant et après neutralisation en cultures cellulaires, sur souris adultes ou nouveau-nées, en œufs embryonnés et sur cobayes. Le virus neutralisé est :

- i) Ensemencé sur 6 tubes roulants de cultures de cellules rénales primaires d'agneau et 6 tubes roulants de cultures de cellules BHK. Les cultures cellulaires sont incubées à 37 °C. On surveille quotidiennement pendant 7 jours l'apparition éventuelle d'ECP, après quoi on soumet les cultures à une épreuve d'hémadsorption avec des hématies de cobayes à 4 °C et à 37 °C. Aucun ECP ni aucune hémadsorption ne doivent apparaître. Si des cultures dégénèrent ou semblent montrer des signes d'ECP, on mélange à nouveau leur contenu avec de l'antisérum puis on le ré-ensemence sur de nouvelles cultures cellulaires. Ces cultures sont maintenues en observation pendant 14 jours supplémentaires. Tout mélange de virus de semence présentant un ECP spécifique ou une hémadsorption sera éliminé.
- ii) Inoculé (0,2 ml) par voie intrapéritonéale à un groupe d'au moins 6 souris adultes et 6 souris âgées de 2 à 5 jours. Les souris doivent rester en bonne santé pendant 14 jours. Si l'une d'entre elles vient à mourir, un prélèvement tissulaire approprié doit être broyé, mélangé avec de l'antisérum puis inoculé à un autre groupe de souris qui seront maintenues en observation pendant une période de 14 jours supplémentaires. En cas de mortalité, le mélange de virus de semence est éliminé.
- iii) Inoculé à au moins 10 œufs de poulet embryonnés âgés de 8 jours, par la méthode « stab » (inoculation simultanée sur la membrane chorio-allantoïdienne et dans la cavité allantoïdienne). Les œufs sont incubés à 37 °C pendant 8 jours, ils font l'objet d'un mirage quotidien. Les embryons qui meurent dans un délai de 24 h ne sont pas pris en compte. Toutefois, l'épreuve devra être renouvelée si la proportion d'embryons vivants après 24 h est inférieure à 70 %. La cause de la mort des embryons au cours de la période d'observation qui suit devra être déterminée à l'aide d'épreuves appropriées d'IH et de stérilité et de l'examen de frottis de vitellus. Si ces épreuves se révèlent négatives, la sub-inoculation de suspensions d'embryon mélangé à de l'antisérum devra s'effectuer comme précédemment. Au quatrième jour de l'incubation, 4 œufs au moins sont ouverts pour prélever du liquide allantoïdien. Les autres œufs sont ouverts au huitième jour d'incubation. On recherche des lésions et des malformations de l'embryon au niveau des membranes des deux groupes d'œufs. Les prélèvements de liquide allantoïdien sont soumis à des épreuves d'IH avec des hématies de cobayes et de poulets, à 4 °C et à 37 °C. Le mélange de virus de semence est éliminé dans les cas suivants : mortalité spécifique des embryons, activité hémagglutinante du liquide allantoïdien, présence de lésions sur la membrane ou malformations de l'embryon.
- iv) Injecté par voie intrapéritonéale (1,0 ml de virus) de semence à 2 cobayes. Les cobayes doivent rester en bonne santé pendant une période d'observation de 14 jours.

L'utilisation de l'antigène en tant que virus de semence est proscrit dès qu'il ne satisfait pas l'une des épreuves.

2. Méthode de fabrication

On reconstitue une ampoule de virus de semence lyophilisé et on le dilue entre 1/100 et 1/1 000 en milieu stérile d'Eagle pour le vaccin à virus atténué, et à 1/1 000 pour le vaccin à virus inactivé. La préparation de la suspension de travail s'effectue de la manière suivante : le virus dilué est ensemencé sur des cultures cellulaires BHK confluentes en flacons roulants, qui sont incubées à 37 °C. Lorsque 70 % des cellules sont affectées (ECP), on récolte le milieu et les cellules. Le matériel est dilué entre 1/100 et 1/1 000, puis on ensemence 10 ml de la solution ainsi obtenue dans des flacons roulants contenant des cellules BHK confluentes. On place à nouveau les flacons en incubation. Dès que l'ECP atteint 70 %, le milieu et les cellules sont récoltées et mélangées.

Le vaccin à virus atténué et le vaccin à virus inactivé font tous les deux l'objet d'un titrage sous forme de suspensions virales injectées par voie intracérébrale à des souriceaux nouveau-nés. Le titre minimum obtenu doit être de $10^{6,5}$ DL₅₀ souris/ml. Une autre méthode consiste à utiliser une plaque de titrage sur cellules CER.

Une fois les épreuves de titrage et de stérilité (bactéries et champignons) terminées, le vaccin atténué est immédiatement lyophilisé.

Un agent stabilisateur doit être utilisé, il pourra s'agir par exemple de 5 % de peptone dans 0,3 M de tampon phosphate. On ajuste le volume de vaccin inactivé de façon à ce que le produit final contienne un minimum de $10^{6,5}$ DL₅₀ souris/ml. Cette suspension virale ajustée est inactivée à 37 °C pendant 24 h, à l'aide de formol à une concentration finale de 0,2 %. Une fois l'inactivation terminée, on ajoute un volume équivalent de gel d'hydroxyde d'alumine à la suspension cellulaire. Le pH du vaccin doit être compris entre 7 et 7,5.

3. Contrôles en cours de fabrication

Avant d'être inoculé en cultures cellulaires, le virus de semence est soumis à des épreuves de stérilité (pour bactéries et champignons) dans du thioglycollate et de l'hydrolysate de caséine de soja (voir la Section C.1.c et se reporter au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »).

On sélectionne un échantillon représentatif de chaque lot de vaccin, puis on le reconstitue dans 5 ml d'eau distillée stérile. On vérifie qu'il ne présente aucune contamination bactérienne ou fongique.

Pour les vaccins inactivés, l'inactivation doit être contrôlée en effectuant deux passages dans le même type de culture cellulaire que celle utilisée pour la production du vaccin.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Avant d'être lyophilisés ou inactivés, le contenu de chaque récipient de mélange de vaccin, et les échantillons représentatifs du lot sont soumis à des épreuves de stérilité dans du thioglycollate et de l'hydrolysate de caséine de soja (se reporter également au Chapitre 1.1.9. de ce *Manuel terrestre*).

b) Innocuité

Vaccin à virus vivant : on choisit de façon aléatoire des récipients de produit final contenant le vaccin inactivé. Le contenu de chaque récipient est reconstitué dans de l'eau distillée, comme pour une vaccination. On inocule une dose de vaccin à quatre moutons sensibles par voie sous-cutanée. Les moutons sont examinés quotidiennement pendant 14 jours et on relève leur température rectale. Les moutons doivent rester en bonne santé.

On injecte également le vaccin par voie intrapéritonéale à six souris adultes (0,25 ml par souris), deux hamsters et deux cobayes (1 ml chacun). Les animaux sont maintenus en observation pendant 14 jours durant lesquels ils doivent rester en bonne santé. Toute mortalité imputable au vaccin conduit à l'élimination du lot.

Vaccin à virus inactivé : dans le cas du vaccin inactivé de la FVR, on injecte 2 ml de vaccin par voie sous-cutanée à des moutons sensibles. Les moutons sont examinés quotidiennement pendant 3 semaines et on relève leur température rectale. Les moutons doivent rester en bonne santé.

On vérifie également l'innocuité du vaccin de la façon suivante : on injecte par voie intracérébrale le vaccin à six souris adultes et à 2 portées d'au moins six souriceaux par portée, ainsi que par voie intrapéritonéale à deux cobayes et deux hamsters. Tous sont maintenus en observation pendant 14 jours et doivent rester en bonne santé. Toute mortalité imputable au vaccin conduit à l'élimination du lot.

c) Activité

Vaccin à virus vivant : On reconstitue le vaccin atténué lyophilisé de deux récipients de produit final, puis on procède à leur titrage par voie intracérébrale sur des souriceaux. Le titre minimum du vaccin final doit être de $10^{4,4}$ DL₅₀ souris/dose. On peut également effectuer ce titrage sur cultures cellulaires.

On conserve deux récipients de produit final à 37 °C pendant une semaine, puis on les reconstitue, et on détermine leur titre comme précédemment. Chaque récipient doit contenir au moins $10^{3,4}$ DL₅₀ souris/dose. On peut également effectuer ce titrage sur cultures cellulaires.

On saigne les moutons inoculés (voir Section C.4.b.) 2 et 3 semaines après les avoir vaccinés. La réponse immunitaire est déterminée par PRN. Un titre en anticorps neutralisant le virus supérieur ou égal à 100 est considéré comme satisfaisant.

Vaccin à virus inactivé: des moutons, inoculés par voie sous-cutanée pour déterminer l'inocuité (Section C.4.b.), sont saignés après 3 semaines et leur réponse en anticorps est déterminée par l'épreuve de SN. Un titre d'anticorps neutralisant le virus égal ou supérieur à 100 est considéré comme satisfaisant.

d) Durée de l'immunité

Le vaccin à virus vivant et le vaccin à virus inactivé ont tous les deux été largement utilisés sur le terrain. Le vaccin à virus vivant est considéré comme procurant à l'animal une immunité à vie contre la maladie bien qu'il existe une controverse sur l'immunogénicité du vaccin de Smithburn. Néanmoins, les bovins peuvent être immunisés avec le vaccin à virus vivant utilisant cette souche. L'expérience sur le terrain de l'efficacité des vaccins à virus inactivés est limitée parce qu'ils sont utilisés dans des régions où le virus de la FVR n'est pas enzootique. Par conséquent, une épreuve naturelle sur le terrain du vaccin ne se produit pas. Cependant, en Afrique du Sud, lors de l'épizootie de FVR en 1976-1978, les observations des Services Vétérinaires ont soutenues l'efficacité du vaccin. Dans des épizooties plus récentes et à d'autres endroits, le vaccin à virus inactivé n'a pas protégé les animaux contre l'avortement, après deux vaccinations. Lors de l'utilisation d'un vaccin à virus inactivé, une dose de rappel doit être effectuée 3-6 mois après la vaccination initiale et la vaccination doit être répétée tous les ans (2, 3).

e) Stabilité

Lorsqu'ils sont conservés à 4 °C, les vaccins à virus atténué lyophilisés restent stables au moins 4 ans. En revanche, les vaccins à virus inactivé restent stables beaucoup plus longtemps. Il est déconseillé de les conserver à des températures plus élevées.

f) Agents de conservation

Aucun agent de conservation n'est utilisé.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Bien que l'homme puisse être infecté par le virus en manipulant des produits contaminés, aucun cas d'infection par le virus-vaccin atténué n'a été signalé, mais il se produit souvent une augmentation du titre d'anticorps. Toutefois, les souches utilisées pour la préparation des vaccins à virus inactivé peuvent causer la maladie. Par conséquent, tous les membres du personnel susceptibles d'être exposés au virus-vaccin doivent recevoir un vaccin inactivé par le formol.

5. Contrôles du produit fini

a) Stérilité

Des échantillons représentatifs du produit final doivent être prélevés et soumis à des tests de stérilité comme il est précisé dans la Section C.4.a.

b) Teneur en humidité

La teneur en humidité du vaccin atténué lyophilisé ne doit pas dépasser 3 %.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AFETINE J.M., TIJHAAR E., PAWESKA J.T., NEVES L.C., HENDRIKS J., SWANEPOEL R., COETZER J.A., EGBERINK H.F. & RUTTEN V.P. (2007). Cloning and expression of Rift Valley fever virus nucleocapsid (N) protein and evaluation of an N-protein based indirect ELISA for the detection of specific IgG and IgM antibodies in domestic ruminants. *Vet. Microbiol.*, **31**, 29–38.
2. BARNARD B.J.H. (1979). Rift Valley fever vaccine – antibody and immune response in cattle to a live and an inactivated vaccine. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **50**, 155–157.
3. BARNARD B.J.H. & BOTHA M.J. (1977). An inactivated Rift Valley fever vaccine. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **48**, 45–48.

4. BARNARD B.J.H. & VOGES S.F. (1986). Flaviviruses in South Africa: Diagnostic procedures. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **53**, 181–185.
5. BIRD B.H., KHRISTOVA M.L., ROLLIN P.E. & NICHOL S.T. (2007). Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry. *J. Virol.*, **81**, 2805–2816.
6. BOTROS B., OMAR A., ELIAN K., MOHAMED G., SOLIMAN A., SALIB A., SALMAN D., SAAD M. & EARHART K. (2006). Adverse response of non-indigenous cattle of European breeds to live attenuated Smithburn Rift Valley fever vaccine. *J. Med. Virol.*, **78**, 787–791.
7. CLARKE D.H. & CASALS J. (1958). Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod bovine viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **7**, 561–573.
8. COACKLEY W., PINI A. & GOSDIN D. (1967). Experimental infection of cattle with pantropic Rift Valley fever virus. *Res. Vet. Sci.*, **8**, 399–405.
9. COETZER J.A.W. (1982). The pathology of Rift Valley fever. 11. Lesions occurring in field cases in adult cattle, calves and aborted fetuses. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **49**, 11–17.
10. COETZER J.A.W. & BARNARD B.J.H. (1977). *Hydrops amnii* in sheep associated with hydranencephaly and arthrogryposis with Wesselsbron disease and Rift Valley fever viruses as ethological agents. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **44**, 119–126.
11. EASTERDAY B.C. (1965). Rift Valley fever. *Adv. Vet. Sci.*, **10**, 65–127.
12. GENTSCH J.R. & BISHOP D.L. (1979). M viral RNA segment of bunyaviruses codes for two glycoproteins, G1 and G2. *J. Virol.*, **9**, 767–770.
13. GERDES G.H. (2004). Rift Valley fever. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **23**(2), 613–623.
14. HUBBARD K.A., BASKERVILLE A. & STEPHENSON J.R. (1991). Ability of a mutagenised virus variant to protect young lambs from Rift Valley fever. *Am. J. Vet. Res.*, **52**, 50–55.
15. HUNTER P. & BOULOY M. (2001). Investigation of C13 RVF mutant as a vaccine strain. Proceedings of 5th International sheep veterinary congress, 21–25 January 2001, Stellenbosch, South Africa. University of Pretoria, South Africa.
16. HUNTER P., ERASMUS B.J. & VORSTER J.H. (2002). Teratogenicity of a mutagenised Rift Valley fever virus (MVP 12) in sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **69**, 95–98.
17. JANSSEN VAN VUREN P., POTGIETER A.C., PAWESKA J.T. & VAN DIJK A.A. (2007). Preparation and evaluation of a recombinant Rift Valley fever virus N protein for the detection of IgG and IgM antibodies in humans and animals by indirect ELISA. *J. Virol. Methods*, **140**, 106–114.
18. JUPP P.G., GROBBELAAR A.A., LEMAN P.A., KEMP A., DUNTON R.F., BURKOT T.R., KSIAZEK T.G. & SWANEPOEL R. (2000). Experimental detection of Rift Valley fever virus by reverse transcription-polymerase chain reaction assay in large samples of mosquitoes. *J. Med. Entomol.*, **37**(3), 467–471.
19. MCINTOSH B.M., RUSSEL D., DOS SANTOS I. & GEAR J.H.S. (1980). Rift Valley fever in humans in South Africa. *S. Afr. Med. J.*, **58**, 803–806.
20. MEADORS G.F., GIBBS P.H., & PETERS C.J. (1986). Evaluations of a new Rift Valley fever vaccine: Safety and immunogenicity trials. *Vaccine*, **4**, 179–184.
21. MEEGAN J.M. (1981). Rift Valley fever in Egypt: An overview of the epizootics in 1977 and 1978. *Contrib. Epidemiol. Biostat.*, **3**, 100–103.
22. MEEGAN J.M. & BAILEY C.L. (1989). Rift Valley fever. In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology, Vol. IV, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 52–76.
23. MORRILL J.C., JENNINGS G.B., CAPLAN H., TURREL M.J., JOHNSON A.J. & PETERS C.J. (1987). Pathogenicity and immunogenicity of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus immunogen in pregnant ewes. *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 1042–1047.

24. MORRILL J.C., MEBUS C.A. & PETERS C.J. (1997). Safety and efficacy of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus vaccine in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 1104–1109.
25. MORRILL J.C., MEBUS C.A. & PETERS C.J. (1997). Safety of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus vaccine in fetal and neonatal bovids. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 1110–1114.
26. MULLER R., SALUZZO J.F., LOPEZ N., DREIER T., TURRELL M., SMITH J. & BOULOY M. (1995). Characterization of clone 13 – a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus which is altered in the small segment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **53**, 405–411.
27. PAWESKA J.T., BURT F.J., ANTHONY F., SMITH S.J., GROBBELAAR A.A., CROFT J.E., KSIAZEK T.G. & SWANEPOEL R. (2003). IgG-sandwich and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in domestic ruminants. *J. Virol. Methods*, **113** (2), 103–112.
28. PAWESKA J.T., MORTIMER E., LEMAN P.A. & SWANEPOEL R. (2005). An inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in humans, domestic and wild ruminants. *J. Virol. Methods*, **127**, 10–18.
29. SALL A.A., DE AZANOTTO P.M., ZELLER H.G., DIGOUTTE J.P., THIONGANE Y. & BOULOY M. (1997). Variability of the NS(S) protein among Rift Valley fever virus isolates. *J. Gen. Virol.*, **78**, 2853–2858.
30. SALL A.A., THONNON J., SENE O.K., FALL A., NDIAYE M., BAUDES B., MATHIOT C. & BOULOY M. (2001). Single-tube and nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of Rift Valley fever virus in human and animal sera. *J. Virol. Methods*, **91**, 85–92.
31. SMITHBURN K.C. (1949). Rift Valley fever; the neurotropic adaptation of the virus and the experimental use of this modified virus as a vaccine. *Br. J. Exp.*, **30**, 1–16.
32. SWANEPOEL R. & COETZER J.A.W. (1994). Rift Valley fever. *In: Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. Vol. 1, Coetzer J.A.W., Thomson G.R. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press, UK.
33. SWANEPOEL R., STUTHERS J.K., ERASMUS M.J., SHEPHERD S.P., MCGILLIVRAY G.M., SHEPHERD A.J., ERASMUS B.J. & BARNARD B.J.H. (1986). Comparative pathogenicity and antigenic cross-reactivity of Rift Valley fever and other African phleboviruses in sheep. *J. Hyg. (Camb.)*, **97**, 331–346.
34. WEISS K.E. (1957). Rift Valley fever – a review. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, **5**, 431–458.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la Fièvre de la vallée du Rift (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

PESTE BOVINE

RÉSUMÉ

La peste bovine classique est une maladie virale des bovins, des buffles et des yaks caractérisée par des taux de morbidité et de mortalité élevés. Les moutons, les chèvres, les porcs et les ongulés sauvages peuvent être atteints. Du point de vue clinique, cette forme de la maladie se caractérise par de l'hyperthermie, un développement progressif d'érosions superficielles sur les gencives, la langue, les joues et le palais qui s'accompagnent de larmolement et de jetage séreux ou mucopurulents. Quand le tractus digestif est atteint, une diarrhée ou une dysenterie apparaît à l'origine d'une déshydratation sévère et l'animal est abattu. La peste bovine qui répond à cette description n'a pas été observée depuis 2001 (Pibor, sud du Soudan). Ces derniers temps, une forme atténuée de la maladie avec possibilité de retour aux caractéristiques classiques survenait fréquemment en Afrique de l'Est associée à des situations d'enzootie : elle n'a toutefois pas été précisément diagnostiquée depuis 1997 (en Tanzanie) et pourrait avoir disparu ; dans ce cas, le virus sauvage de la peste bovine pourrait ne plus exister. Grâce aux collections de virus « historiques », 3 lignées génétiques distinctes ont été définies comme agents responsables de la peste bovine en Afrique et en Asie. L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a lancé un Programme d'éradication global de la peste bovine (GREP pour Global Rinderpest Eradication Programme) en 1992, visant à l'éradication du virus en 2010. Le succès de ce programme devrait être évalué sur la confirmation de l'éradication définitive de deux des trois lignées et qu'il pourrait bien en être de même avec la troisième.

Identification de l'agent pathogène : *la confirmation clinique de la peste bovine classique est basée sur la découverte d'animaux ou de petits groupes d'animaux présentant de la fièvre, sans appétit, abattus, ayant des érosions superficielles des lèvres supérieure et inférieure et des gencives, une érosion ou une abrasion des papilles des joues, des écoulements séreux ou mucopurulents oculaires et/ou nasaux, de la diarrhée, étant couchés en décubitus, ou trouvés morts. La confirmation du laboratoire est basée sur la mise en évidence du virus, de son ARN ou d'antigène précipitant dans des échantillons provenant de la rate, des nœuds lymphatiques ou des sécrétions oculaires ou nasales d'animaux ayant une forme aiguë. Il est particulièrement important d'isoler le virus si une extension géographique ou si une détérioration significative de l'état de la santé animale apparaissent. Si l'éradication au niveau mondial réussit, les pays indemnes de peste bovine pourront alors confirmer la présence de la Peste des petits ruminants (PPR) chez les moutons et les chèvres sur l'apparence clinique des animaux et sur la mise en évidence d'antigènes précipitants, tant bien même ces deux manifestations s'expriment à l'identique pour ces deux virus.*

Lors de suspicion de peste bovine, il convient lors des examens post-mortem de faire particulièrement attention à la caillette, qui peut être très distendue ou montrer des décolorations grises ; aux plaques de Peyer, qui peuvent présenter une nécrose lymphoïde et au cæcum ; au colon et au rectum qui développent des stries d'inflammation et dont les crêtes et les replis ont viré au noir. Le diagnostic différentiel porte sur la PPR chez le mouton et la chèvre, la diarrhée virale bovine, la maladie des muqueuses ou le coryza gangreneux chez les bovins ; la distinction entre ces maladies requiert la mise en œuvre de méthodes de laboratoires appropriées.

Épreuves sérologiques : *l'OIE a énoncé un ensemble de Principes généraux pour la surveillance épidémiologique de la peste bovine (Procédure OIE) qui gouvernent l'action des Pays Membres souhaitant démontrer qu'ils ont rempli les conditions pour être déclarés indemne d'infection. Pour cela il existe une méthode immuno-enzymatique (ELISA) de compétition qui permet de mettre en évidence*

la présence d'anticorps anti-peste bovine chez des animaux qui ont été infectés avec des souches sauvages ou qui ont été vaccinés avec la souche vaccinale. Un ELISA indirect a aussi été décrit. Quelque soit le test retenu, il devra être sensible vis-à-vis de la lignée de virus ayant de fortes probabilités de circuler dans le pays mais aussi très spécifique. La mise en évidence des anticorps neutralisants peut également avoir le même but. Les Pays Membres peuvent souhaiter recevoir conseil d'un expert d'un Laboratoire de référence de l'OIE ou du secrétariat du GREP pour le choix de l'épreuve la plus appropriée.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *il existe une souche vaccinale du virus de la peste bovine obtenue par atténuation sur culture cellulaire. Ces dernières années, son utilisation a été considérablement réduite car l'immunité de longue durée qu'elle peut interférer avec le suivi vaccinal des campagnes nécessaire pour l'obtention par un pays du statut de pays indemne. Compte tenu du fait que l'utilisation accidentelle du vaccin a donné lieu à des résultats sérologiques confus lors de la surveillance de la maladie et qu'il existe toujours des quantités considérables de vaccin, les Pays Membres devraient répertorier et consigner tous les stocks restants pour garantir la capacité de mener à bien la sérosurveillance.*

A. INTRODUCTION

Ces dernières années, le Programme d'éradication global de la Peste bovine (GREP pour *Global Rinderpest Eradication Programme*) de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a contribué à d'énormes avancées en organisant et en documentant le déclin de la peste bovine (13). Historiquement, le virus était largement réparti en Europe, en Afrique et en Asie. Récemment, cependant, il n'a sévi qu'en Afrique et en Asie. L'analyse de séquences génomiques a montré que toutes les souches de peste bovine appartiennent à l'une des trois lignées phylogénétiques individualisées et que, ces dernières années, la répartition géographique des lignées de virus a pu être dressée. Ainsi, la lignée appelée lignée asiatique (lignée 3) n'a été signalée qu'en Afghanistan, en Inde, en Irak, au Koweït, à Oman, au Pakistan, en Russie, en Arabie Saoudite, en Turquie, au Sri Lanka et au Yémen. Le résultat des campagnes de vaccination concertées et coordonnées et de sérosurveillance a empêché cette lignée de virus de refaire surface depuis septembre 2000 (Pakistan). Bien que les évaluations ne soient pas tout à fait complètes, il est presque certain que ce virus a été éradiqué avec succès.

Les lignées 1 et 2 de peste bovine n'ont été signalées qu'en Afrique. La lignée 1 paraît être répartie de l'Égypte au sud Soudan ainsi que vers l'est jusqu'en Éthiopie et dans l'extrême nord et ouest du Kenya. D'autre part, la lignée 2 a été signalée en Afrique de l'Est et de l'Ouest et, à un certain moment, elle a envahi toute la ceinture sub-saharienne de part et d'autre du continent (12). Cependant, de nos jours, après la poursuite des vaccinations coordonnées et des programmes de surveillance (Pan African Rinderpest Campaign en particulier), les parties ouest et centrale de l'Afrique n'ont pas déclaré la maladie depuis 1988 (Ghana/Burkina Faso). Jusqu'à une date récente, les deux lignées étaient signalées en Afrique de l'est mais il est certain maintenant que la lignée 1 a été éliminée du sud Soudan en 2001, grâce à une intense campagne de vaccinations.

Réapparue en 1994, en 1996 et en 2001 chez la faune sauvage, la lignée 2 a été transmise à l'intérieur de l'écosystème pastoral somalien (9) où sa présence a constitué une préoccupation considérable (10). En 1994, ce virus a réapparu dans le sud-est du Kenya avec des effets des plus sévères sur les buffles du Parc National de Tsavo (7) illustrant ainsi la possibilité qu'il a eue de persister de façon inexplicable pendant au moins 30 ans, temps pendant lequel il semble s'être transmis à bas niveau de virulence chez les bovins. Bien que ce virus semble avoir évolué au point d'échapper à la vigilance des vétérinaires dans les endroits reculés, sa présence n'a pas échappé aux pasteurs nomades dont il a infecté le bétail. Cependant, il semble évident que ce virus n'a pas été observé dans ces régions depuis 2001 et, bien que le succès ne soit pas confirmé, il est probable que les vaccinations sporadiques ont cassé la chaîne de transmission de la lignée 2.

L'agent causal de la peste bovine est un virus à ARN négatif appartenant au genre *Morbillivirus* dans la famille *Paramyxoviridae*. Dans la description classique de la peste bovine, il est fait référence à une maladie extrêmement mortelle pour le bétail, les buffles et les yaks. Le virus atteint également certaines races de porcs et une très grande variété d'espèces de la faune sauvage dans l'ordre des Artiodactyles, sans toujours présenter une forme clinique apparente : une récente synthèse bibliographique considère que les moutons et les chèvres sont sensibles, mais qu'ils ne jouent pas un rôle épidémiologique important dans la peste bovine (14).

Bien que l'éradication de la peste bovine ait été dans sa phase finale, quelques souches du virus ont évolué pour ne plus provoquer qu'une maladie infectieuse atténuée et non mortelle des bovins ; toutefois, ces souches conservaient deux caractères de dangerosité. Le premier était la possibilité quasi certaine de modulations de sa virulence. Le second était sa capacité à infecter le gibier et à générer chez le buffle, la girafe, le petit kudu et le phacochère, une infection aiguë associée à de forts taux de mortalité.

Dans la forme classique de la peste bovine, la période d'incubation est de 1 à 2 semaines et la maladie clinique qui suit est caractérisée par une attaque fébrile au cours de laquelle on distingue une phase prodromale et une phase érosive. La phase prodromale dure environ 3 jours pendant lesquels on observe de la fièvre (entre 40 °C et 41,5 °C), de l'anorexie, de la constipation, de la congestion des muqueuses, du larmolement et du jetage séreux, de l'abattement et un dessèchement de la muqueuse du muflle. Cependant ce n'est que lors de la phase érosive avec le développement des lésions nécrotiques de la bouche qu'un diagnostic clinique de peste bovine peut être envisagé. Au pic de température, de petites plaques épithéliales nécrosées apparaissent sur la gencive et la lèvre inférieures, qui s'étendent rapidement à la gencive supérieure, aux côtés de la langue, à la face interne des joues et aux papilles, ainsi qu'au palais. Du fait de l'accroissement des lésions existantes et de l'apparition de nouveaux foyers, la nécrose de la cavité buccale s'étend de façon dramatique au cours des 2 à 3 jours suivants. La plus grande partie des tissus nécrosés tombe pour laisser place à des érosions peu profondes et non-hémorragiques de la muqueuse.

La diarrhée est un autre trait caractéristique de la peste bovine et se développe en 1 à 2 jours après l'apparition des lésions buccales. La diarrhée est généralement importante, liquide mais peut contenir ultérieurement du mucus, du sang et des lambeaux d'épithélium et peut s'accompagner, dans les cas sévères, de ténésme. Pendant la phase érosive, une nécrose peut s'observer dans le nasopharynx, sur la vulve et le vagin et sur le fourreau. L'anorexie s'accroît, le muflle se dessèche complètement, l'animal est déprimé, la respiration est fétide et le larmolement et le jetage mucopurulents se développent.

Il y a de la mortalité mais le taux est variable et peut augmenter si le virus atteint un grand nombre d'animaux sensibles. Les taux initiaux de mortalité sont aux alentours de 10 à 20 % et aux stades terminaux de la maladie, les animaux peuvent tomber en décubitus pendant 24 à 48 h avant de mourir. Certains d'entre eux meurent avec des lésions sévères de nécrose, une forte fièvre et de la diarrhée, d'autres après une chute rapide de la température, souvent en dessous de la normale. À l'opposé, au milieu de la phase érosive, la température peut se calmer puis, 2 à 3 jours plus tard retourner complètement à la normale avec une cicatrisation rapide des lésions buccales, un arrêt de la diarrhée et une convalescence sans complications.

De façon typique, la carcasse de l'animal mort est déshydratée, émaciée et souillée. Le muflle et les joues portent les traces du larmolement et du jetage mucopurulents, les yeux sont enfoncés dans les orbites et la conjonctive est congestionnée. Dans la cavité buccale, l'épithélium nécrosé est souvent complètement desquamé et forme une démarcation nette avec les parties saines de la muqueuse adjacente. Les lésions s'étendent fréquemment au voile du palais et peuvent inclure le pharynx et la partie haute de l'œsophage. Le rumen, le bonnet et le feuillet sont le plus souvent indemnes, bien que des plaques de nécroses soient trouvées de façon occasionnelle sur les piliers du rumen. La caillette, et spécialement la région du pylore sont sévèrement atteintes et montrent une congestion, une pétéchisation et un œdème de la sous-muqueuse. La nécrose épithéliale donne à la muqueuse une couleur grise. L'intestin grêle n'est généralement pas impliqué excepté par l'altération notable des plaques de Peyer dont la nécrose lymphoïde et la desquamation laisse l'architecture de base congestionnée et noirâtre. Dans le gros intestin, les changements concernent la valvule iléo-caecale, les cils caecaux et les crêtes des plis longitudinaux du coecum, la muqueuse du colon et le rectum. Les plis apparaissent très congestionnés dans le cas de mort brutale ou avec une décoloration noirâtre dans les cas prolongés ; dans les deux situations, ces lésions forment les « zébrures » typiques.

La forme clinique associée à la lignée 2 est un bon exemple de forme atténuée de peste bovine telle qu'elle est rencontrée dans les zones d'enzootie : la période d'incubation est de 1 à 2 semaines et la maladie clinique qui suit se résume en un pic de température ou à peine plus. La fièvre est fluctuante, transitoire (3 à 4 jours) et est peu élevée (38 à 40 °C). Les animaux qui développent des formes frustes ne présentent pas la dépression caractéristique des formes plus aiguës et comme ils ne perdent pas leur appétit, ils continueront de brouter, de boire et de marcher comme les animaux sains. Ils n'ont généralement pas de diarrhée. En pratiquant un examen plus poussé, on peut déceler une congestion des muqueuses et sur les gencives inférieures, de petites zones d'érosion épithéliales surélevées et blanchâtres, parfois pas plus grandes qu'une tête d'épingle, et quelques papilles érodées. Certains animaux peuvent ne pas développer de telles érosions, dont la manifestation est brève. D'autres peuvent montrer de discrètes sécrétions séreuses oculaires ou nasales, mais, n'évoluant pas vers la purulence contrairement à ce qui se passe dans formes plus sévères de la maladie.

Même si l'infection par le virus de lignée 2 peut passer inaperçue chez le bovin, il est hautement pathogène pour les espèces de la faune sauvage et pour celles généralement considérées comme sensibles (buffle, girafe, éland et petit koudou) il génère de la fièvre, du jetage, une stomatite nécrosante, une gastroentérite et la mort. En outre, Kock (7) a observé que les buffles infectés par la lignée 2 présentaient des nœuds lymphatiques périphériques hypertrophiés, des lésions de kératinisation en plaque de la peau et une kératoconjunctivite. Les petits koudous étaient atteints à l'identique, mais alors que chez eux la cécité causée par une kératoconjunctivite sévère était ordinaire, la diarrhée elle, n'était pas usuelle. Les élands montraient aussi une nécrose et une érosion de la muqueuse buccale accompagnée d'une déshydratation et d'une émaciation. Aussi, dans de telles conditions, un diagnostic de peste bovine chez une de ces espèces privilégie l'hypothèse d'une transmission concurrente du virus aux bovins avoisinants, même à un niveau sub-clinique.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Au vu des grands espoirs soulevés par la *Campagne globale d'éradication de la peste bovine* (GREP), tout nouveau foyer de peste bovine revêtira, au plan épidémiologique, une signification considérable, non seulement en tant que menace pour une nouvelle panzootie, mais aussi en tant qu'indicateur des lacunes dans la séro-surveillance mondiale. En conséquence, tant qu'un pays n'a pas atteint le statut de pays officiellement indemne d'infection par le virus de la peste bovine (statut reconnu sur la base de la séro-surveillance), tous les échantillons d'un foyer diagnostiqué comme de la peste bovine sur des bases cliniques ou pathologiques devront être envoyés en routine pour confirmation par le laboratoire. Une variété d'épreuves de laboratoire adaptées est disponible, mais dans le contexte décrit ci-dessus, il est d'une importance cruciale d'isoler le virus, d'identifier la lignée et d'attester de sa virulence par une infection expérimentale de bovins (1). Le sang prélevé sur anticoagulant est le prélèvement de choix dans la mesure du possible. En moyenne, la virémie précède de peu la poussée de température et peut s'étendre sur 1 à 2 jours au-delà de la fièvre. Aussi, les animaux faisant de la température sont probablement virémiques et donnent alors les meilleurs prélèvements sanguins pour l'isolement viral. Cependant, comme des animaux fébriles peuvent parfois ne plus être virémiques, des échantillons de plusieurs animaux fébriles doivent être prélevés. Il est important de s'assurer lors de la première soumission, que le tissu provenant du foyer suspect est en quantité suffisante pour au moins deux tentatives d'isolement. Les autres procédures décrites doivent seulement être entreprises s'il y a du tissu en trop.

a) Isolement du virus

Le virus de la peste bovine peut être cultivé à partir de la fraction des leucocytes du sang total qui a été collecté sur héparine à la concentration finale de 10 unités internationales (UI)/ml ou sur EDTA (acide éthylène-diamine-tétra-acétique) à 0,5 mg/ml. Les échantillons doivent être parfaitement mélangés et transférés au laboratoire sur glace, mais non congelés. Le virus peut être isolé à partir des échantillons de rate, des ganglions mésentériques et préscapulaires des animaux morts ; ces échantillons doivent être congelés pendant le transport.

Pour isoler le virus du sang, le sang non coagulé est centrifugé à 2 500 *g* pendant 15 min pour produire la couche leucocyto-plaquettaire à la lisière du plasma et des érythrocytes. Il est prélevé aussi proprement que possible, mélangé avec 20 ml de solution physiologique salée et centrifugé à nouveau dans un protocole incluant des lavages pour éliminer les anticorps neutralisants présents dans le plasma. Le culot cellulaire obtenu est resuspendu dans un milieu de culture d'entretien et des aliquots de 2 ml sont répartis sur des cellules de rein de veau, des cellules B95a d'ouistiti ou des cellules de rein de singe (Vero) en culture dans des tubes rond de Leighton. Le milieu de culture doit être remplacé tous les 2 à 3 jours et la culture observée au microscope pour l'apparition éventuelle de l'effet cytopathogène (ECP). Celui-ci est caractérisé par la réfringence, la rétraction et l'arrondissement des cellules et la formation de ponts inter-cytoplasmiques et/ou de syncytiums. La vitesse avec laquelle l'ECP se développe varie en fonction de la cellule hôte et certainement aussi selon le virus. Douze jours suffisent en culture cellulaire de première explantation, une semaine en cellules Vero et 2 à 4 jours en cellules B95a. Des passages en aveugle doivent être entrepris si l'échantillon est négatif, mais il faudrait de préférence inoculer la suspension cellulaire ou le restant de l'échantillon original en intraveineuse à un bovin sensible à la peste bovine et essayer de ré-isoler le virus à partir de son sang. Les virus isolés peuvent être partiellement identifiés par mise en évidence dans les débris cellulaires infectés de précipitogènes spécifiques des morbillivirus ou totalement identifiés par immunofluorescence à l'aide d'anticorps monoclonaux (AcMs).

De façon alternative, le même résultat peut être obtenu à partir de 20 % de la suspension (p/v) de nœud lymphatique ou de la rate. Les tissus doivent macérer dans du milieu d'entretien sans sérum après broyage et laceration par des techniques classiques et inoculés à des cellules comme précédemment. La libération du virus à partir de tissu peut être obtenue de différentes manières. La plus facile est peut-être avec un pilon et un mortier, mais cette technique requiert du sable stérile comme abrasif. Autrement, le tissu peut être broyé sans abrasif avec des broyeurs en verre, par exemple le broyeur Ten Broeck. Des techniques de broyage sont aussi possibles en utilisant des mixeurs tels que les appareils Silverson ou Waring. Les suspensions contenant du virus sont centrifugées à basse vitesse. Le volume de l'inoculum n'est pas important ; un volume de travail doit être de l'ordre de 1 à 2 ml. Les antibiotiques utilisés communément sont la pénicilline et la streptomycine en mélange, chacun à une concentration de 100 UI/ml. Une couverture à un aussi large spectre peut être obtenue avec de la néomycine à 50 µl/ml. La fungizone doit être ajoutée à 2,5 µg/ml.

b) Détection de l'antigène par immunodiffusion en gélose

L'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) doit être exécutée en boîte de Petri ou sur une lame de microscope (5). Dans les deux cas, la surface doit être couverte avec de l'agarose sur une épaisseur d'environ 4 mm avec une solution aqueuse à 1 % d'agarose de qualité supérieure. Les puits sont découpés avec un emporte-pièce hexagonal à 6 puits périphériques autour d'un puits central. Sur lames, les puits doivent avoir 3 mm de diamètre et être distants de 2 mm. Pour la boîte de Petri, les puits peuvent atteindre 4 mm de diamètre et être distants de 3 mm. Plus les puits sont rapprochés, plus courte sera la réaction.

En utilisant une pipette de petit volume le sérum hyperimmun de lapin anti-peste bovine doit être placé dans le puits central. De même, l'antigène témoin positif, préparé à partir de nœuds lymphatiques d'un lapin infecté par la souche lapinisée Nakamura III de peste bovine, doit être placé tous les deux puits en périphérie (première, troisième et cinquième). Le témoin antigène négatif est placé dans le puits quatre. Les antigènes à tester sont les exsudats récupérés à la surface de la rate ou de nœud lymphatique après section ; si aucun exsudat ne peut être obtenu, une petite partie de l'échantillon peut être broyé avec un peu de solution physiologique salée. Les larmes oculaires peuvent être directement déposés en pressant les écouvillons ou à l'aide d'un cône de pipette (le coton doit être découpé de l'écouvillon et placé par le grand côté du cône de 50 à 250 µl ; la tige de l'écouvillon sert alors à comprimer le coton et à pousser l'exsudat par la petite extrémité du cône). Les échantillons à tester sont placés dans les puits deux et six. L'épreuve est réalisée de préférence à 4 °C ou à basse température ambiante. La zone de réaction doit être examinée à partir de la deuxième heure pour voir apparaître les lignes de précipitation nettes et fines entre les puits et former une ligne d'identité avec les témoins. L'épreuve doit être arrêtée et recommencée si aucun résultat n'a été obtenu après 24 h. Le résultat n'est pas satisfaisant tant que les réactions de précipitation n'ont pas donné de lignes d'identité avec la préparation des témoins positifs.

Bien que la réaction ne soit ni très sensible ni très spécifique, elle est fiable et s'adapte aux conditions de terrain. Une réaction positive à partir d'un grand ruminant devrait être considérée comme de la peste bovine. S'il s'agit d'un petit ruminant, un résultat positif devrait être considéré comme dérivant d'un cas de peste bovine ou de peste des petits ruminants (PPR) ce qui demande alors un supplément de différenciation.

c) Histopathologie et immunohistochimie

À l'examen post-mortem, pour l'histopathologie et l'immunochimie, les tissus doivent être prélevés et placés dans du formol tamponné à 10 % ; les tissus à prélever sont : la base de la langue, les ganglions du rétropharynx et la membrane nictitante. Des formations syncytiales et des cellules à inclusions virales intranucléaires doivent être recherchées dans les sections colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. L'antigène peste bovine peut être mis en évidence dans des tissus fixés au formol par réaction à l'immunoperoxydase après extinction de l'activité peroxydase endogène. Si un anti-sérum polyclonal est utilisé, cette épreuve ne pourra différencier les virus de la peste bovine et de la PPR. Mais le problème sera contourné si on utilise des anticorps monoclonaux spécifiques de la peste bovine et de la PPR dans des tests réalisés en double (3).

d) Identification de la lignée par transcription inverse couplée à une amplification en chaîne par polymérase

La transcription inverse couplée à l'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) (6) produit de l'ADN utilisable pour l'analyse par séquençage. L'ARN viral peut être purifié à partir de la rate (pas idéale à cause de sa haute teneur en sang), les nœuds lymphatiques et les amygdales (idéal), les lymphocytes du sang périphérique (LSP), ou des écouvillonnages des yeux ou des lésions buccales (sous réserve). Les tissus (0,5 à 1,0 g) sont broyés et homogénéisés avec 4,0 ml de solution de lyse, les écouvillons oculaires et buccaux sont traités avec 1,0 ml et les LSP purifiés (à partir de 5 à 10 ml de sang total) sont traités avec 0,4 ml selon la procédure publiée. La solution D (solution de lyse) : on recommande la procédure suivante pour minimiser les risques liés à la manipulation du thiocyanate de guanidium qui est toxique. Il doit être manipulé dans une sorbonne. Les quantités suivantes valent pour un flacon de 250 g de thiocyanate, mais d'autres volumes peuvent être ajustés à des quantités différentes. Ne pas essayer de peser le thiocyanate de guanidium, mais le diluer dans le flacon d'origine avec 293 ml d'eau stérile, 17,6 ml de citrate de sodium à 0,75 M, pH 7,0 et 26,4 ml de sarcosyl à 10 %, puis chauffer à 65 °C dans un bain-marie pour la dissolution. La solution peut être gardée plusieurs mois dans le noir à température ambiante dans une armoire chimique de sûreté. La solution finale D est obtenue par l'addition de 0,36 ml de 2-mercaptoéthanol pour 50 ml de solution stock. Cette solution ne doit pas être conservée plus de 1 mois. Au cours des dernières années, les colonnes « spin » se sont généralisées pour la purification d'ARN de haute qualité (RNeasy kit, Qiagen). L'ARN obtenu est précipité avec 2,5 volumes d'éthanol, lavé dans de l'éthanol à 70 %, dissout dans de l'eau stérile ou du tampon TE (Tris/EDTA, 10 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) et conservé à –70 °C ou –20 °C jusqu'à utilisation. La synthèse de l'ADNc est obtenue avec des amorces aléatoires hexanucléotidiques pour permettre l'usage des différents couples d'amorces spécifiques dans l'étape d'amplification PCR. Des aliquots de l'ADNc obtenus sont amplifiés avec au moins 3 couples d'amorces pouvant détecter et différencier les 2 morbillivirus. Les couples d'amorce incluent deux couples d'amorces

« universelles » basées sur des régions conservées du gène de la phosphoprotéine et de la nucléoprotéine et devraient détecter tous les morbillivirus et un couple d'amorces spécifiques du virus de la peste bovine basées sur des séquences du gène de fusion du virus. Les produits de PCR sont analysés sur un gel d'agarose à 1,5 % (p/v) en utilisant un marqueur de poids moléculaire approprié pour identifier le produit ADN spécifique. Un témoin positif comme l'ARN du virus de la rougeole ou de la maladie de Carré et un contrôle négatif avec de l'eau plutôt que de l'ARN doivent être inclus dans chaque RT-PCR. Les réactions positives doivent être confirmées soit, par PCR nichée avec des amorces basées sur des séquences du gène de la F, soit par séquençage du produit de PCR. Pour mettre en évidence des virus à ARN, il est important d'utiliser plus d'un couple d'amorce dans l'étape de PCR car leur séquence nucléotidique peut varier de façon notable et le changement d'une base à l'extrémité 3' de la séquence de l'amorce peut résulter en un défaut d'amplification de l'ADN. Le Laboratoire de Référence Mondial au Royaume-Uni, qui est aussi un Laboratoire de référence de l'OIE pour la peste bovine et le Laboratoire de référence de l'OIE en France (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*), peuvent donner conseil sur l'usage de techniques applicables aux prélèvements de terrain.

Plus récemment, une RT-PCR simple Taqman en temps réel a été décrite pour le diagnostic de la peste bovine. Cette RT-PCR en temps réel a été validée et s'est révélée très sensible avec des surnageants de cultures cellulaires infectées et avec des échantillons cliniques obtenus à partir de bovins expérimentalement infectés. L'épreuve s'est aussi révélée capable de détecter des isolats de toutes les lignées phylogénétiques connues et de distinguer nettement le virus de la peste bovine du virus de la PPR (et des virus des maladies qui lui ressemblent telles que fièvre aphteuse, diarrhée virale bovine, herpèsvirose, stomatite vésiculeuse). La sensibilité analytique du système amorce-sonde L10 a atteint 1 à 100 DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire)/ml, selon la souche de virus de la peste bovine. Une étude comparative sur des échantillons provenant d'animaux expérimentalement infectés a montré que les lymphocytes et les écouvillons conjonctivaux sont les échantillons de choix pour la surveillance épidémiologique de la maladie, car ils permettent la détection de la maladie 2 à 4 jours avant l'apparition des symptômes. Dans le cas d'un foyer de peste bovine, cette RT-PCR en temps réel avec un seul tube et transportable est capable d'un diagnostic pré-clinique, ce qui facilite la prévention d'une transmission ultérieure de la maladie.

e) ELISA d'immunocapture différentiel

L'observation clinique ni même les épreuves d'IDG ne peuvent différencier la peste bovine de la PPR, en conséquence, si l'une des deux maladies est suspectée chez le mouton ou la chèvre dans des pays où les deux maladies se rencontrent, d'autres épreuves comme la RT-PCR en temps réel doivent être mis en jeu. Une différenciation rapide peut être obtenue avec la méthode immuno-enzymatique (ELISA) d'immunocapture différentielle (8). Ce test emploie des AcMs dirigés contre la protéine N des deux virus. Un des AcMs ayant une réactivité contre les deux virus, est utilisé comme anticorps de capture, alors qu'un second anticorps biotinylé, spécifique d'un site antigénique de la protéine N non partagé et dirigé soit contre la peste bovine, soit contre la PPR, est utilisé pour déterminer quelle protéine N a été capturée.

Des plaques à haut pouvoir de fixation sont sensibilisées avec 100 µl/puits d'anticorps dilué à la dilution de travail recommandé par le fournisseur avec 0,01 M de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS, *Phosphate Buffered Saline*), pH 7,4. Après 3 lavages, les puits sont remplis avec 50 µl d'échantillon à éprouver, 25 µl d'anticorps biotinylé spécifique et 25 µl de streptavidine peroxydase à la dilution recommandée par le fournisseur du tampon de blocage (PBS 0,01 M, Tween 20 ; 0,1 % [v/v] et sérum d'agneau 0,5 %). Les plaques sont alors placées sur un agitateur orbital pendant 1 h à 37 °C, après quoi elles sont de nouveau lavées : après addition de 100 µl de mélange substrat/chromogène (1 part de H₂O₂ à 3 % pour 250 parts d'ortho-phénylènediamine (OPD), les plaques sont laissées à température ambiante pendant 10 mn. La réaction est arrêtée par addition de 100 µl/puits d'acide sulfurique 1 N, les valeurs d'absorption mesurées à 492 nm avec un lecteur ELISA automatisé, et exprimées en pourcentage de positivité (PP) par rapport aux contrôles positifs peste bovine et PPR inclus dans le test.

f) Test chromatographique sur bandelette

Bien qu'il ne donne pas un diagnostic définitif, ce test chromatographique sur bandelette (d'exécution rapide réalisable au chevet de l'animal ; référence 4) s'est révélé utile pour aider les agents de terrain lors de foyers suspects.

2. Épreuves sérologiques

a) Méthode immuno-enzymatique de compétition (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Un test ELISA de compétition est disponible et permet la détection des anticorps anti-peste bovine dans le sérum des animaux de n'importe quelle espèce qui pourraient avoir été exposés au virus (ou au vaccin).

L'épreuve est basée sur la capacité des sérums positifs à entrer en compétition avec un AcM anti-H de peste bovine pour la reconnaissance de l'antigène. La présence de tels anticorps dans l'échantillon va bloquer la fixation de l'AcM, produisant une réduction de la réaction colorée attendue lors de l'addition du conjugué enzymatique anti-souris et la solution de substrat/chromogène. Comme cette épreuve est réalisée en phase solide, des étapes de lavage sont nécessaires pour éliminer les réactifs non fixés.

L'antigène peste bovine est préparé à partir de cellules de rein de bovin Madin-Darby infectées par la souche atténuée de peste bovine Kabete "O". L'extraction de l'antigène viral est réalisée par des cycles répétés de sonication et de centrifugation. L'AcM a été obtenu par fusion de splénocytes de souris hyperimmunisées et de cellules de la lignée myélomateuse NSO, puis caractérisé comme étant spécifique de la protéine H de la peste bovine (2) ; cet AcM est maintenant dénommé C1. L'AcM C1 et l'antigène normalisés sont directement disponibles au Laboratoire de référence de l'OIE pour la Peste bovine au RU (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Des kits de diagnostic sont disponibles dans le commerce.

- **Protocole**

- i) Reconstituer l'antigène de peste bovine lyophilisé avec 1 ml d'eau stérile et le diluer à la dilution de travail recommandé par le fournisseur avec 0,01 M de PBS, pH 7,4 ;
- ii) Répartir immédiatement l'antigène dilué à raison de 50 µl dans un nombre suffisant de puits d'une plaque à fond plat à haut pouvoir de fixation de protéines et en utilisant deux puits pour chaque sérum test. Taper la plaque sur la tranche pour bien répartir l'antigène sur le fond des puits et après avoir recouvert la plaque, la mettre à incuber sur un agitateur orbital pendant 1 h à 37 °C. Laver les puits 3 fois avec du PBS à 0,002 M, pH 7,4 ;
- iii) Ajouter 40 µl de tampon de blocage (PBS 0,01 M, Tween 20 ; 0,1 % [v/v] et sérum normal de bovin 0,3 %) à chaque puits suivi de 10 µl pour chacun des sérums tests ;
- iv) Suivre les recommandations du fournisseur pour préparer la dilution de travail de l'AcM dans le tampon de blocage et ajouter 50 µl de celui-ci dans chacune des puits. Recouvrir la plaque et incuber de nouveau sur l'agitateur orbital pendant 1 h à 37 °C ;
- v) Suivre les recommandations du fournisseur pour préparer une dilution de travail du conjugué immunoglobuline de lapin anti-souris/peroxydase de radis noir dans du tampon de blocage et distribuer 50 µl dans chaque puits. Couvrir les plaques et incuber à nouveau sur un agitateur rotatif pendant 1 h à 37 °C ;
- vi) À la suite de cette étape les plaques sont lavées comme précédemment et immédiatement 50 µl de mélange substrat/chromogène (1 part de H₂O₂ à 3 % pour 250 parts d'OPD) sont ajoutés et incubés à température ambiante pendant 10 min sans agitation, puis 50 µl de la solution d'arrêt (acide sulfurique à 1 M) ;
- vii) Dans la disposition de plaque de l'épreuve inclure des sérums peste bovine positifs et négatifs et prévoir des puits contrôles pour l'AcM et le conjugué ;
- viii) Mesurer les valeurs d'absorbance avec un lecteur ELISA réglé sur 492 nm et exprimer les résultats des sérums tests en pourcentage d'inhibition par rapport à la valeur de l'AcM contrôle. Les valeurs d'inhibition supérieures ou égales à 50 % sont considérées comme positives et celles en deçà, comme négatives.

Abaissier le seuil positif/négatif à 40 % (ou moins) améliore la sensibilité du test, mais affecte inévitablement la spécificité en augmentant le nombre de résultats faux positifs. Pratiquement le seuil de 50 % est recommandé par le GREP : dans ce cas, la sensibilité est de 70 % et la spécificité dépasse 99 %. Il convient de prendre en compte la sensibilité quand sont décidés les programmes d'échantillonnage pour la séro-surveillance.

Une méthode ELISA indirecte a été développée et pourrait être utile pour les programmes de surveillance de la peste bovine, spécialement dans les régions où la lignée 2 peut être présente (17). Cependant, les caractéristiques de performance de cette épreuve indiquent un défaut de sensibilité. Sa mise en œuvre requiert donc des épreuves de confirmations.

b) Test de séroneutralisation

Le test de séroneutralisation (SN), considéré comme « l'étalon-or » doit être réalisé en tubes roulants ensemencés avec des cellules de rein de veau d'après la méthode de Plowright et Ferris (11) ; le test a été validé sur des bovins expérimentalement infectés. Dans cette procédure, des sérums non inactivés sont dilués de 10 en 10. Le sérum initial non dilué et ses différentes dilutions sont mélangés avec un volume égal de virus contenant approximativement 10^{3,0} DICT₅₀/par ml de la souche vaccinale Kabete 'O'. Les mélanges sont gardés à 4 °C toute la nuit, puis des volumes de 0,2 ml sont inoculés dans chacun des 5 tubes de

Leighton qui reçoivent immédiatement 1 ml d'une suspension de cellules indicatrices en milieu de culture à la concentration de 2×10^5 cellules/ml. Les tubes sont incubés à 37 °C, inclinés pendant les 3 premiers jours, puis remis à niveau avec du milieu de culture et placés sur le portoir de tubes. Ils sont examinés régulièrement en vue d'observer l'ECP et les tubes positifs sont répertoriés et enlevés ; l'examen final est aux alentours de 10 jours.

Pour calculer les titres finaux, la dose virale est considérée comme satisfaisante si la dilution finale se situe entre $10^{1,8}$ à $10^{2,8}$ DICT₅₀/tube. Ce test est recommandé pour confirmer ou infirmer les sérums ELISA positifs trouvés lors des programmes nationaux de surveillance entrepris en vue de démontrer qu'un pays est indemne d'infection. Il peut aussi servir à trouver les animaux éligibles d'un essai vaccinal. Dans ce cas, la présence d'anticorps à la dilution finale de 1/2 indique une infection antérieure avec la peste bovine. La SN est l'épreuve de choix pour l'examen des sérums de la faune sauvage.

Une microméthode sur plaque peut être utilisée comme épreuve de dépistage. Dans cette procédure, la dilution initiale du sérum est de 1/5 et est ensuite diluée de 2 en 2. Puis des volumes de 50 µl de sérum sont incubés avec 50 µl de virus dilué entre $10^{1,8}$ et $10^{2,8}$ DICT₅₀ (15). Après une période d'incubation de 45 min ou une nuit, des cellules de rein de veau, de rein d'agneau ou des Vero ajustées entre 1 et 2×10^5 sont ajoutées comme cellules indicatrices. Le test prend fin après 6 ou 7 jours. Il peut se révéler donner une neutralisation non spécifique à haute concentration de sérum. Il semble que les sérums normaux aient des facteurs (indépendamment d'une exposition à la peste bovine) qui empêcheraient le virus de pénétrer et de se répliquer dans les cellules indicatrices. Dans les tubes, ces facteurs sont certainement éliminés avec les changements de milieu ; avec la méthode en microplaques, ils persistent. À une dilution finale du sérum de 1/10, l'effet disparaît.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Beaucoup de pays ont utilisé le vaccin peste bovine pour descendre l'incidence de cette maladie proche du zéro puis ont suivi la procédure OIE pour obtenir le statut de pays indemne reconnu internationalement. Pour obtenir ce statut, les campagnes annuelles de vaccination ont été remplacées en grande partie par la surveillance clinique et sérologique active et passive. La vaccination intensive focale avec un vaccin homologue (immunostérilisation) a été retenue pour régler la gestion des campagnes d'urgence (16).

Le vaccin vivant atténué de la peste bovine produit sur culture tissulaire (VPCT) décrit dans les éditions précédentes de ce *Manuel terrestre* a été développé par Plowright par passages successifs de la souche virulente Kabete 'O' de peste bovine (RBOK) en culture cellulaire de première explantation de rein de veau. En raison du succès du GREP, peu de producteurs continuent à fabriquer ce vaccin, bien que certains puissent garder des stocks considérables. Cependant, la description publiée dans la précédente édition de ce *Manuel terrestre* est reprise ci-dessous afin qu'elle reste disponible si les conditions venaient à changer.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Les lots de semence utilisés pour la production de VPCT doivent donner un vaccin sûr, conférer une immunité chez le bovin d'une durée de 5 ans, retenir ses caractéristiques d'atténuation durant au moins 5 passages chez le bovin et sa capacité de passage par contact. Des souches dérivant de la souche RBOK utilisée pour la production du VPCT doit être identifiable par des enregistrements historiques incluant des informations sur l'origine de la souche et les manipulations consécutives.

b) Méthode de culture

La souche vaccinale doit être maintenue dans un système lot de semence entre des passages compris entre 90 et 120. Le virus du lot de semence doit être préservé lyophilisé à une température de -20 °C ou moins. Le virus doit être cultivé sur cellules Vero ou sur des cellules de première explantation ou sur des cellules cultivées en série de rein dérivées de fœtus normal de bovin ou d'un très jeune veau. Les cellules cultivées en série ne doivent pas dépasser 10 passages retranchés des passages de culture de première explantation.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

On doit pouvoir démontrer que les lots de semence sont :

- i) *Pures* : indemnes de contaminations virales, bactériennes, fongiques ni par des mycoplasmes.

- ii) *Sûrs* : n'induisent pas de réactions cliniques anormales après inoculation chez des bovins sensibles à la peste bovine.
- iii) *Efficaces* : induisent une immunité contre la peste bovine chez les bovins sensibles à la peste bovine.

2. Méthode de fabrication

Les lots individuels de vaccin sont préparés par infection de cultures cellulaires et après une période d'incubation suffisante, par récolte du surnageant dans lequel une grande quantité de virus vivant a été libéré. Pour faciliter le stockage pour de longues durées et la distribution en chaîne du froid, ce liquide est lyophilisé en présence de cryoprotecteur consistant en 5 % d'hydrolysate de lactalbumine et de 10 % de sucrose. Le virus peut être produit en cellules de première explantation de rein à partir d'embryons de bovin ou à partir de veaux, et sur ces mêmes cellules jusqu'au dixième passage par une méthode homogène. De plus, le vaccin peut être produit sur des cellules de lignées agréées, dans la mesure où elles ne sont pas infectées par le virus de la diarrhée virale bovine et sont maintenues par un système lots de semence. Les cellules Vero ont été utilisées dans cet objectif. Pour constituer un lot, les cellules infectées doivent avoir été inoculées avec la même souche virale et incubées et récoltées en même temps. Deux récoltes sont permises pour le même lot de cultures et peuvent être rassemblées pour former une suspension poolée. Des enregistrements écrits doivent accompagner toutes les étapes de la production de vaccin.

3. Contrôles en cours de fabrication

Cellules : Les cellules de première explantation, les cellules de première explantation cultivées par passage ou les cellules de lignées continues doivent avoir été obtenues d'animaux ou d'embryons d'aspect normal et doivent garder une morphologie normale pendant la culture. On doit montrer qu'elles sont indemnes de contaminations par des virus adventices, particulièrement le virus BVD. Quelles que soient les cellules en jeu pour produire le vaccin, des cultures non infectées doivent être maintenues avec le même milieu de culture et conditions d'incubation utilisées pour les cellules infectées par le vaccin. Elles doivent être souvent observées au microscope. Après avoir récolté le vaccin, les cultures de contrôle doivent être lavées pour enlever le sérum de bovin et ré-incubées pendant 10 jours dans du milieu contenant du substitut de sérum de bovin. Elles sont de nouveau observées au microscope pour les changements cytopathogènes éventuels. Simultanément un échantillon de la culture est contrôlé pour la présence éventuelle de virus BVD non cytopathogène par une épreuve d'immunofluorescence ou d'immunoperoxydase ou par RT-PCR. Le sérum utilisé dans les cultures cellulaires doit provenir d'animaux sensibles à la peste bovine.

Virus : Une titration du virus doit être entreprise sur le lot de semence en utilisant une dilution du virus au 1/10 soit sur microplaque soit dans un système de tubes roulants et en effectuant 10 mesures par dilution. Une titration similaire doit être entreprise sur le volume final. Le virus doit être obtenu de cultures maintenues dans des bouteilles en rouleau et peut ne pas être récolté plus de 10 jours après infection des cultures. La récolte doit être clarifiée par centrifugation lente avant d'être mélangée avec un cryoprotecteur. Avant d'être lyophilisé, le mélange ainsi obtenu peut être maintenu à 4 °C, si la durée ne dépasse pas 5 jours, mais doit être congelé entre -20 et -60 °C, si l'on souhaite le conserver en l'état beaucoup plus longtemps. Une contamination adventice pouvant survenir du fait des manipulations du fabricant ou du fait de l'utilisation de milieux contaminés, le sérum de lapin hyperimmun doit être utilisé pour neutraliser la suspension poolée de peste bovine, après quoi le mélange doit être utilisé pour infecter les cellules de rein de veau ou Vero comme mentionné ci-dessus. La suspension finale devra être contrôlée pour vérifier l'absence de bactéries, champignons et mycoplasmes.

4. Contrôle des lots

a) Identité

Le contenu du conteneur de chaque lot mis en route doit être mis en contact avec l'anticorps de lapin anti-peste bovine en utilisant une méthode à virus variable/sérum constant et inoculé à des cellules de rein de bovin. L'identité du produit est établie si aucun ECP spécifique de la peste bovine ne se développe.

b) Stérilité

Le contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques peut être trouvé au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

c) Innocuité et efficacité

En utilisant des bovins sensibles, le contenu de 5 flacons sélectionnés par tirage aléatoire est poolé. Un bovin est inoculé avec l'équivalent de 100 doses et un autre avec 1/10^e de dose. Les animaux sont maintenus en contact étroit avec un bovin n'ayant rien reçu pendant les 3 semaines suivantes. Pendant cette période, les animaux sont soumis à des inspections cliniques. À la fin de la période, leur sérum est

éprouvé pour la présence d'anticorps neutralisant anti-peste bovine et les animaux sont éprouvés avec une souche de peste bovine capable d'induire de la fièvre. Le vaccin est considéré comme sûr et efficace s'il ne produit aucune réaction clinique anormale, si les deux animaux ayant reçu le vaccin sont protégés et s'il n'y a pas d'évidence que la souche vaccinale se soit transmise à l'animal contact. Ce test n'évalue pas le pouvoir du vaccin. Chaque vaccin doit être testé pour son innocuité chez des petits animaux.

d) Activité

La relation étroite entre le pouvoir immunisant et l'infectivité permet à cette dernière caractéristique d'être utilisée comme référence pour estimer le premier. Trois titrages de l'infectivité sont entrepris en utilisant des cellules de lignées cellulaires normalisées ou des cellules de rein de 3 veaux ou fœtus différents. Pour le premier titrage, le pool des flacons utilisé pour le test d'activité peut être employé. La seconde et la troisième estimation sont réalisées avec des pools provenant de containers définitifs. La sensibilité des cellules utilisées dans chaque session de travail doit être mesurée en utilisant une préparation de laboratoire normalisée de virus de peste bovine. Le titre final est la moyenne géométrique des 3 estimations, chacune étant effectuée avec des dilutions de 10 en 10 et 10 observations par dilutions.

e) Durée de l'immunité

Il est nécessaire d'établir en routine la durée de l'immunité du VPCT. On a l'indication qu'une immunité à vie peut être envisagée après une vaccination réussie chez des bovins indemnes de tout reliquat d'immunité maternelle.

f) Stabilité

Le VPCT est très stable quand il est correctement lyophilisé et peut résister sur de longues périodes à +4 °C ou –20 °C à la condition que le produit soit gardé sous vide. Une preuve récente indique que la vitesse de dégradation du VPCT lyophilisé peut être modifiée par le choix du stabilisant et par la modulation des cycles de lyophilisation. Les résultats les plus avantageux sont obtenus grâce aux stabilisants comme le mélange d'hydrolysate de lactalbumine à 5 % et de sucrose à 10 %, un cycle de lyophilisation sur 72 à 74 h en dépression réduite (100 milliTor), une lyophilisation initiale de 16 h à –30 °C et une température finale du plateau à 35 °C. Avec des titres en sortie de production élevés, de tels vaccins peuvent être utilisés sur le terrain pendant 30 jours sans nécessiter de réfrigération. Après reconstitution, soit en tampon physiologique, soit en sulfate de magnésium 1 M, le virus devient bien plus thermolabile. Sur le terrain, le temps minimum pour administrer le vaccin reconstitué ne doit pas dépasser sa demi-vie, mais comme ce paramètre dépend de la température et varie de 8 à 24 h pour une amplitude de 4 °C à 37 °C, une limite de bon sens doit être établie ; elle peut être déterminée par les Autorités Nationales de Contrôle, mais une période universelle de 4 h peut être recommandée.

g) Agents de conservation

Le VPCT contient de l'hydrolysate de lactalbumine et du sucrose qui sont ajoutés comme cryoprotecteurs; autrement, il ne contient pas de conservateur spécifique.

h) Précautions d'emploi et mise en garde

Il n'y a pas de risques associés à la production ou l'utilisation sur le terrain du VPCT.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANDERSON J., BARRETT T. & SCOTT G.R (1966). Manual on the Diagnosis of Rinderpest, Second Edition. FAO Animal Health Manual No.1. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 143 pp.
2. ANDERSON J., MCKAY J.A. & BUTCHER R.N. (1991). The use of monoclonal antibodies in competitive ELISA for the detection of antibodies to rinderpest and peste des petits ruminants. *In: The Seromonitoring of Rinderpest Throughout Africa. Phase One. Proceedings of Final Research Co-ordination Meeting. Joint FAO/IAEA (Food and Agriculture Organisation of the United Nations/International Atomic Energy Agency) Division, Vienna, Austria, 43–53.*
3. BROWN C.C. (1997). A review of three pathology-based techniques for retrospective diagnosis of rinderpest, with comparison to virus isolation. *Res. Vet. Sci.*, **63**, 103–106.
4. BRUNING A., BELLAMY K., TALBOT D. & ANDERSON J. (1999). A rapid chromatographic test for the pen-side diagnosis of rinderpest virus. *J. Virol. Methods*, **81**, 143–154.

5. FOREMAN A.J., ROWE L.W. & TAYLOR W.P. (1983). The detection of rinderpest antigen by agar gel diffusion and counterimmunoelectrophoresis. *Trop. Anim. Health Prod.*, **15**, 83–85.
6. FORSYTH M.A. & BARRETT T. (1995). Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Res.*, **39**, 151–163.
7. KOCK R.A. (2006). Rinderpest and wildlife. *In: Rinderpest and Peste des Petits Ruminants, Virus Plagues of Large and Small Ruminants*, Barrett T., Pastoret P.-P. & Taylor W.P., eds. Academic Press, Oxford, UK, 143–162.
8. LIBEAU G., DIALLO A., COLAS F. & GUERRE L. (1994). Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Vet. Rec.*, **134**, 300–304.
9. MARINER J.C. & ROEDER P.L. (2003). Use of participatory epidemiology in studies of the persistence of lineage 2 rinderpest virus in East Africa. *Vet. Rec.*, **152**, 641–647.
10. OAU-IBAR-PACE (ORGANIZATION OF AFRICAN UNITY-INTERAFRICAN BUREAU FOR ANIMAL RESOURCES-PAN-AFRICAN PROGRAMME FOR THE CONTROL OF EPIZOOTICS) (2002). Report on the Eastern African Regional Workshop on Mild Rinderpest. Nairobi, Kenya, 17–19 June 2002.
11. PLOWRIGHT W. & FERRIS R.D. (1961). Studies with rinderpest virus in cell culture. III. The stability of cultured virus and its use in neutralisation tests. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **11**, 516–533.
12. ROEDER P.L. & TAYLOR W.P. (2002). Rinderpest. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **18**, 515–547.
13. ROEDER P.L., TAYLOR W.P. & RWEYEMAMU M.M. (2006). Rinderpest in the twentieth and twenty first centuries. *In: Rinderpest and Peste des Petits Ruminants, Virus Plagues of Large and Small Ruminants*, Barrett T., Pastoret P.-P. & Taylor W.P., eds. Academic Press, Oxford, UK, 105–142.
14. TAYLOR W.P. & BARRETT T. (2007). Peste des Petits Ruminants and Rinderpest in Diseases of Sheep, Fourth Edition, Aitken I.D., ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
15. TAYLOR W.P. & ROWE L.W. (1984). A microneutralisation test for the detection of rinderpest virus antibodies. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **37**, 155–159.
16. TAYLOR W.P., ROEDER P.L., RWEYEMAMU M.M., MELEWAS J.N., MAJUVA P., KIMARO R.T., MOLLEL J.N., MTEI B.J., WAMBURA P., ANDERSON J., ROSSITER P.B., KOCK R., MELENGEYA T. & VAN DEN ENDE R. (2002). The control of rinderpest in Tanzania between 1997 and 1998. *Trop. Anim. Health Prod.*, **34**, 471–487.
17. YILMA T., AZIZ F., AHMAD S., JONES L., NGOTHO R., WAMWAYI H., BEYENE B., YESUS M., EGZIABHER B., DIOP M., SARR J. & VERARDI P. (2003). Inexpensive vaccines and rapid diagnostic kits tailor-made for the global eradication of rinderpest, and technology transfer to Africa and Asia. *Dev. Biol. (Basel)*, **114**, 99–111.

*

* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la Peste bovine (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

TRICHINELLOSE

RÉSUMÉ

La Trichinellose humaine est due à l'ingestion de viande d'animaux de rente ou de gibiers, crue ou peu cuite et infestée par Trichinella. Les vers adultes survivent moins de 2 mois dans l'intestin grêle des espèces hôtes y compris les hommes, les porcs, les rats, les ours, les morses, parfois les chevaux et beaucoup d'autres mammifères carnivores ou détritvovores, ainsi que les oiseaux et les reptiles. Les larves de Trichinella sont présentes dans les muscles de leurs hôtes et l'ingestion de ces tissus contenant ces larves transmet l'infestation à un individu sensible.

Identification de l'agent pathogène : les épreuves de diagnostic de la trichinellose appartiennent à deux catégories : 1) la détection directe du stade larvaire enkysté ou libre dans les muscles striés, et 2) la détection indirecte de l'infestation par des épreuves utilisant des anticorps spécifiques.

Deux méthodes sont principalement utilisées pour le dépistage direct de Trichinella : la méthode de compression ou la digestion artificielle des muscles striés. Les larves de Trichinella sont localisées en général dans les muscles de prédilection, notamment lors d'infestation légères, et ces sites peuvent varier selon l'espèce hôte. Les échantillons doivent concerner en priorité ces sites électifs afin de maximiser la sensibilité des épreuves. Par exemple, chez le porc : le diaphragme (pilier), la langue, les masséters, les muscles abdominaux, tandis que chez les chevaux, les muscles de la langue et les masséters présentent le plus de larves, suivis par le diaphragme et les muscles du cou.

Les méthodes par digestion artificielle mettent en œuvre la digestion enzymatique d'un seul muscle ou d'un pool de muscles et incluent une homogénéisation mécanique ou un broyage, un mélange plus une incubation. Cette étape est suivie par une filtration et une sédimentation pour récupérer et concentrer toutes les larves qui sont libérées lors de la digestion des muscles. Les échantillons traités par ces méthodes sont ensuite examinés au stéréomicroscope pour détecter les larves. Les tests de digestion peuvent détecter moins de 1 larve par gramme (lpg) de tissu, mais les faibles niveaux d'infestation et la distribution irrégulière au sein des tissus sont autant de facteurs limitants. Cela est compensé en testant plus d'échantillons par carcasse comme un minimum de 1 à 5 g pour les porcs et de 5 à 10 g pour les chevaux et le gibier. Ces méthodes de digestion sont recommandées pour l'inspection individuelle des carcasses de porcs, de chevaux et de gibiers lorsque leur viande est destinée à la consommation humaine.

La méthode par compression est moins sensible que la digestion artificielle et n'est pas recommandée car peu fiable pour l'inspection des carcasses. Bien que maintenant dépassée, cette méthode a été largement utilisée et n'est mentionnée ici que pour être exhaustive. Elle implique une inspection visuelle de tissu musculaire compressé afin de détecter les larves encapsulées in situ. Cette méthode peut être effectuée avec un stéréomicroscope ou un microscope spécialisé, le trichinoscope. Il permet la détection d'au moins 3 larves/gramme de tissu. L'inconvénient principal de cette méthode réside dans les contraintes de temps nécessaire à la lecture d'échantillons multiples pour chaque carcasse. Il est également très difficile de détecter les larves qui ne sont pas encapsulées dans du collagène de Trichinella (T. pseudospiralis, T. papuae et T. zimbabwensis). Les méthodes par compression ne sont utiles que pour la détection d'infestations moyennes à fortes lorsque peu d'animaux doivent être inspectés et que les installations ne sont pas disponibles pour l'épreuve par digestion artificielle.

Épreuves sérologiques : les épreuves sérologiques sont les tests les plus couramment utilisés pour la détection indirecte. La sensibilité et la spécificité des méthodes sérologiques sont fortement liées au choix de l'antigène utilisé et à sa qualité. Les informations sur la plupart des tests ont été

obtenues chez les porcs. Une réponse sérologique faussement négative des porcs faiblement ou modérément infestés peut être observée dans les 3 semaines (ou plus) après que les larves musculaires soient devenues infestantes. Un taux faible de résultats faussement positifs a également été décrit pour les épreuves sérologiques. Dans le cas d'inspection de carcasses individuelles, seules les méthodes de détection directes sont recommandées. Pour la surveillance ou la vérification d'élevages ou de régions indemnes de trichines, les méthodes sérologiques sont acceptables. Des infestations aussi faibles que 1 larve/100 g de tissu ont été détectées chez le porc. La spécificité du test immuno-enzymatique (ELISA) pour *Trichinella* est directement liée au type et à la qualité de l'antigène employé dans le test. Les antigènes de sécrétions récoltés après que des larves musculaires de *T. spiralis* aient été maintenues pendant un court laps de temps (18 à 20 h) dans le milieu de survie in vitro, et les antigènes synthétiques carbohydratés, sont actuellement la source spécifique la plus économique de réactif ; toutefois un faible nombre de faux positifs a été obtenu dans certaines études. Il est essentiel que des sérums témoins positif et négatif soient incorporés dans le test pour garantir que les ELISAs présentent des niveaux minimums de sensibilité et de spécificité. La digestion de 100 g ou plus de tissu est recommandée en tant qu'épreuve de confirmation pour les animaux détectés positifs en sérologie.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : il n'existe pas de vaccin utilisable contre les infestations par *Trichinella* chez les animaux de rentes. Pour les méthodes de dépistage indirect (sérologique), des antigènes appropriés doivent être utilisés pour assurer une spécificité et une sensibilité suffisantes de l'épreuve. Ces antigènes peuvent être obtenus à partir des produits d'excrétion-sécrétion de larves musculaires maintenues in vitro. Le besoin d'une banque internationale de sérums étalons de référence se fait sentir cruellement afin de fournir des normes communes à tous pour les épreuves sérologiques pour le diagnostic des *Trichinella*.

A. INTRODUCTION

La Trichinellose humaine est due à l'ingestion de viande d'animaux de rente ou de gibiers, crue ou peu cuite et infestée par *Trichinella* (10). Le ver adulte de *Trichinella* sp. vit peu de temps dans l'intestin grêle des espèces hôtes comme l'homme, le porc, le rat, l'ours, le morse, le cheval et d'autres mammifères carnivores, mais aussi des oiseaux et des reptiles. Le parasite a un cycle direct. Quelques heures après la consommation de tissu musculaire infesté par un hôte sensible, les larves musculaires de premier stade (L1) sont libérées par la digestion et s'enfoncent dans les villosités de l'intestin grêle. Elles se développent rapidement en adultes (longueur des mâles jusqu'à 1,8 mm, des femelles jusqu'à 3,7 mm) et survivent moins de 2 mois. Pendant ce temps, la copulation a lieu et les femelles ovo-vivipares pondent de nouvelles larves (NL) qui migrent vers la circulation générale via les veinules et les vaisseaux lymphatiques. Les NL sont dispersées dans l'ensemble du corps et envahissent les muscles striés, avec une prédilection pour certains groupes de muscles. Par exemple, chez le porc, la langue héberge généralement la plus forte concentration de larve suivie par le diaphragme, tandis que chez le cheval c'est la langue suivie des masséters. Les sites de prédilection varient avec l'espèce hôte, mais en général, la langue, les masséters et le diaphragme sont les sites de choix pour les prélèvements. La liste des sites de prédilection pour plusieurs espèces hôtes est disponible (22). En cas d'infestation sévère, les muscles striés contiennent le plus grand nombre de larves. Les larves de la plupart des espèces de *Trichinella* s'entourent d'une capsule de collagène au sein des muscles de l'hôte où elles restent infestantes pendant plusieurs années.

Onze géotypes ont été identifiés dans le genre *Trichinella*, dont 8 ont reçu le statut d'espèce (10, 21, 27). *Trichinella spiralis* (aussi appelée T-1) est distribuée dans les régions tempérées du monde entier et elle est communément associée aux porcs domestiques. Cette espèce est très infestante pour les porcs domestiques ou sauvages, les souris et les rats, mais elle peut être aussi retrouvée chez d'autres mammifères carnivores. *Trichinella nativa* (T-2) infeste des mammifères carnivores des régions arctiques ou subarctiques d'Amérique du Nord, d'Europe et d'Asie. *Trichinella britovi* (T-3) est principalement retrouvée chez les animaux sauvages et occasionnellement chez des porcs ou des chevaux. Elle se distribue géographiquement dans les régions tempérées d'Europe et d'Asie ainsi qu'en Afrique du Nord et de l'Ouest. *Trichinella pseudospiralis* (T-4) a une distribution cosmopolite et a été retrouvée chez des oiseaux rapaces, des carnivores et omnivores sauvages, notamment des rats et des marsupiaux en Asie, en Amérique du Nord, en Europe et en Australie. Contrairement à la plupart des géotypes de *Trichinella*, T-4 ne forme pas de capsule de collagène dans les muscles. *Trichinella murelli* (T-5) est une espèce d'Amérique du Nord trouvée chez des mammifères carnivores. Elle a un faible pouvoir infestant pour les porcs domestiques mais représente un risque pour les humains consommant de la viande de gibiers. *Trichinella* T-6 est une espèce adaptée aux climats froids et semble être associée étroitement à *T. nativa* en Amérique du Nord (27). Tant *T. nativa* que T-6 sont très résistantes à la congélation. Elles n'ont qu'un faible pouvoir infestant pour le porc. *Trichinella nelsoni* (T-7) a été isolée de mammifères carnivores et, de manière sporadique, de porcs sauvages en Afrique de l'Est. *Trichinella* T-8 a été trouvée chez des mammifères carnivores

en Namibie et en Afrique du Sud, et *Trichinella* T-9 chez des mammifères carnivores au Japon (27). T-8 et T-9 ont des caractéristiques intermédiaires de *T. britovi* et *T. murelli* respectivement. *T. pseudospiralis*, *T. papuae* (T-10) et *T. zimbabwensis* (T-11) ne forment pas de capsule dans les muscles. *Trichinella papuae* a été signalée chez des porcs domestiques et sauvages, des crocodiles d'élevage et des hommes en Papouasie Nouvelle-Guinée. *Trichinella zimbabwensis* a été signalée chez des crocodiles sauvages et d'élevage au Zimbabwe, en Éthiopie et au Mozambique ainsi que chez des lézards monitor au Zimbabwe. Expérimentalement, il démontre un fort pouvoir infestant pour une large gamme de mammifères, y compris les porcs et les rats (27). Toutes les espèces et les génotypes de *Trichinella* sont responsables de maladie chez les humains.

La trichinellose humaine est une maladie débilitante qui peut entraîner parfois la mort de l'individu. Le parasite adulte ayant une vie de courte durée dans l'intestin peut provoquer une gastro-entérite temporaire, mais les signes cliniques les plus sévères résultent de la migration et de la présence des larves dans les muscles striés. La maladie est transmise par la consommation de viande infestée qui a été insuffisamment cuite (ou insuffisamment traitée par un autre procédé stérilisant). La prévention de l'infestation humaine est fondée sur l'inspection des viandes, leur préparation (cuisson, congélation ou salaison de la viande) et par la prévention de l'exposition des animaux de rente à de la viande infestée comprenant des restes de nourriture non cuite, des rongeurs ou des animaux de la faune sauvage (10, 12, 13). Le gibier doit toujours être considéré comme une source potentielle d'infestation, et les viandes de gibier doivent être inspectées ou parfaitement cuites. *Trichinella* trouvée dans les gibiers (principalement *T. nativa*, T-6 et dans une moindre mesure *T. britovi*) peuvent être résistantes à la congélation et la congélation de cette viande non examinée reste donc un problème de santé publique.

Les méthodes de diagnostic pour la détection de l'infestation à *Trichinella* chez les porcs ou d'autres espèces comprennent : (a) la mise en évidence directe du parasite dans les échantillons de tissu, (b) la mise en évidence indirecte du parasite par des techniques immunologiques spécifiques des anticorps dirigés contre *Trichinella* spp. dans le sérum ou des échantillons de liquides tissulaires.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Les seules procédures recommandées pour la détection des larves de *Trichinella* dans la viande sont les épreuves de digestion. Un certain nombre d'épreuves est officiellement reconnu dans divers pays à des fins de commerce. La Commission internationale sur la Trichinellose (ICT = *International Commission on Trichinellosis*) recommande plusieurs de ces épreuves qui sont les normes documentées de l'Union Européenne, du Canada et des États-Unis d'Amérique. Cependant, un certain nombre d'autres méthodes officielles, qui ne sont pas actuellement utilisées en routine, ne sont pas recommandées en raison de leur manque d'efficacité et de fiabilité. Les épreuves de diagnostic modernes doivent être en accord avec les normes d'assurance qualité qui comprennent la validation scientifique des données et un protocole permettant le suivi en routine et la documentation des points critiques. Bien qu'un consensus général existe sur le fait que l'épreuve de digestion est la meilleure épreuve, un protocole accepté par l'ensemble de la communauté internationale en vue du commerce et de la sécurité sanitaire des aliments n'est toujours pas disponible. L'épreuve de digestion recommandée ci-dessous tient compte d'innovations souhaitées pour certaines épreuves de digestion actuellement acceptées pour le commerce international.

a) Procédure directe recommandée pour l'examen des viandes

Sensibilité : la sensibilité des méthodes de dépistage direct dépend de la quantité de tissu examiné et du site musculaire où a été prélevé l'échantillon. Les méthodes directes vont identifier les porcs infestés, les chevaux ou les autres animaux infestés par *T. spiralis* à partir de 17 jours suivant l'infestation, ce qui coïncide avec le moment où les larves deviennent infestantes pour un nouvel hôte. Les méthodes directes restent fiables tant que les larves musculaires sont viables. Afin de garantir la viabilité des trichines, les échantillons de tissu ne doivent pas être conservés trop longtemps ou congelés avant examen. Les méthodes courantes pour l'épreuve par digestion artificielle employant un échantillon de 1 g ont une sensibilité d'approximativement 3 larves/g de tissu et une épreuve sur un échantillon de 5 g augmente la sensibilité à 1 larve/g de tissu (13, 22). Lorsque de grandes quantités de tissus (jusqu'à 100 g) sont disponibles pour la digestion, la sensibilité de cette épreuve est considérablement augmentée.

Échantillonnage : la mise en évidence directe des parasites est généralement réalisée à l'inspection post-mortem des carcasses. Les échantillons sont prélevés au niveau des sites de prédilection, en général les piliers du diaphragme ou la langue chez les porcs ou les masséters chez les chevaux. La taille des échantillons peut varier ; des échantillons de 100 g peuvent être prélevés sur un animal individuel ou plusieurs échantillons de moindre quantité peuvent être prélevés sur plusieurs animaux pour obtenir un mélange de 100 g. La taille des échantillons qui entreront dans le mélange déterminera la sensibilité de

l'épreuve. L'ICT recommande 5 g d'échantillon par porc pour examen dans les zones d'enzootie. Pour l'examen des viandes de cheval, au moins 5 g par carcasse sont nécessaires. Quand les chevaux proviennent d'une zone d'enzootie, il est recommandé de prélever 10 g.

- **Digestion et détection**

- i) Déterminer le volume de la solution de digestion nécessaire pour la digestion (2 000 ml de solution pour 100 g de viande et 1 000 ml pour 50 g ou moins).
- ii) Solution de digestion : préparer un volume approprié de solution aqueuse à 37 % de HCl (0,55 % v/v 37 % HCl) en mélangeant l'HCl avec de l'eau du robinet (par ex. : 11 ml d'HCl à 37 % avec 1989 ml d'eau). Ne pas ajouter la pepsine à la solution à ce moment. Cette solution doit être pré-chauffée à 45 °C avant utilisation.
- iii) Retirer autant que possible la graisse et les aponévroses des échantillons de viande.
- iv) Peser la quantité appropriée de viande de chaque échantillon. Découper les échantillons en cubes de 1 à 2 g et les mélanger avec les autres échantillons pour atteindre un poids de 100 g.
- v) Déposer les échantillons de viande mélangés dans un broyeur. Ajouter 50 à 100 ml de la solution eau/HCl pour 100 g de mélange.
- vi) Broyer la viande jusqu'à l'obtention d'une masse homogène (aucun morceau de viande ne doit subsister ; le mélange doit avoir la consistance d'une purée pour bébé). Cela est en général obtenu après plusieurs impulsions de 1 à 3 s. Ajouter environ 100 ml de la solution eau/HCl et mélanger jusqu'à l'obtention d'une consistance uniformément liquide. Cela peut prendre 5 à 10 s (il peut être nécessaire de rajouter de la solution).
- vii) Asperger de 10 g de pepsine (1:10 000 NF/1: 12 500 BP/2 000 FIP ; de préférence sous forme granuleuse) sur l'homogénat et ajouter environ 200 ml de la solution eau/HCl puis mélanger pendant environ 5 s.
- viii) Transférer l'échantillon homogénéisé dans un cristallisateur de 3 litres avec un barreau aimanté. Ajouter le restant des 2 litres de la solution eau/HCl en versant le reste de la solution dans le broyeur pour le rincer le mélange résiduel et verser le tout dans le cristallisateur. Rincer tout matériel adhérent aux parois du broyeur à l'aide de 10 à 20 ml de la solution de digestion.
- ix) Placer le cristallisateur sur un agitateur magnétique pré-chauffé dans une étuve réglée à 45 ± 2 °C. Couvrir le cristallisateur avec une feuille d'aluminium. Mettre en marche de façon à créer un vortex assez profond mais en évitant les éclaboussures. Note : si la température n'est pas de 45 ± 2 °C au début de la digestion, il est recommandé de laisser l'échantillon se réchauffer avant de démarrer la digestion.
- x) Laisser la digestion se poursuivre pendant 30 min. Si la température est descendue en-dessous de 45 ± 2 °C, la digestion sera maintenue plus longtemps. La digestion est contrôlée en observant le mélange : si des morceaux de muscles non digérés sont visibles, la digestion sera poursuivie pendant encore 30 min ou jusqu'à digestion totale des morceaux. Le plus grand soin sera apporté pour ne pas dépasser la température de digestion. Une autre méthode consiste à pratiquer la digestion à 37 °C mais pendant plus longtemps.
- xi) Retirer le cristallisateur de l'agitateur magnétique et dans les 5 min qui suivent verser le liquide de digestion à travers un tamis à mailles de 177 à 180 µm dans une ampoule à décanter de 2 litres. Rincer le cristallisateur avec de l'eau du robinet à température ambiante (juste un jet d'eau est suffisant) et ajouter cette eau au liquide de digestion à travers le tamis dans l'ampoule à décanter de 2 litres.
- xii) Rincer aussi le tamis avec de l'eau du robinet et ajouter dans l'ampoule. Il ne doit pas rester de morceaux non-digérés, seulement des restes de graisse et d'aponévrose. Laisser reposer pendant 30 min.
- xiii) Verser 40 ml du liquide de digestion de l'ampoule à décanter dans un tube conique de 50 ml ou une éprouvette graduée (fiolle Pilsner) et laisser reposer pendant 10 min.
- xiv) Après 10 min. aspirer 30 ml avec une pipette à partir de la fraction supérieure du surnageant et laisser 10 ml au fond du tube (aspirer les 30 ml et ne pas les verser pour éviter de perturber le dépôt de sédimentation).

- xv) Agiter doucement les 10 ml restants et transférer rapidement dans une boîte de Petri quadrillée ou une cuvette de comptage des larves. Rincer le tube 2 fois avec 5 ml d'eau du robinet chaque fois et verser dans la boîte de Petri. La couche de liquide dans la boîte de Petri ne doit pas avoir plus de quelques millimètres d'épaisseur.
- xvi) Attendre au moins 1 min pour laisser les larves se déposer sur le fond de la boîte, et examiner chaque carré de la boîte pour la présence de larve de *Trichinella* avec un stéréo-microscope (grossissement $\times 10$ à 16). La détection de toute larve suspecte lors de l'examen systématique doit être confirmée par une identification des détails morphologiques à un plus grand grossissement ($\times 40$). Si le sédiment est trouble ce qui rend l'examen difficile, une clarification supplémentaire est nécessaire comme cela est décrit ci-dessous.
- xvii) Les liquides doivent être examinés rapidement après la digestion. L'examen ne doit en aucun cas être reporté au lendemain.
- xviii) Si les liquides ne sont pas examinés dans les 30 min suivantes, ils pourront nécessiter une clarification comme cela est décrit ci-dessous.
- xix) Clarification des échantillons : à l'aide d'une pipette, transférer le contenu d'une boîte de Petri dans un tube conique de 50 ml. Rincer soigneusement la boîte de Petri avec de l'eau du robinet et ajouter dans le tube conique. Ajouter de l'eau jusqu'à obtenir un volume de 45 ml. Laisser le tube au repos pendant 10 min.

Après 10 min, aspirer le surnageant avec une pipette et laisser 10 ml au fond du tube (ne pas verser le surnageant pour ne pas troubler le sédiment). Conserver le liquide aspiré pour permettre la décontamination lorsque l'échantillon sera examiné.

Répéter les étapes xv et xvi.

- xx) Dans le cas d'un résultat positif ou douteux, un autre échantillon devra être prélevé à partir de chacune des carcasses ayant été à la base du mélange. Ces échantillons seront examinés séparément ou par des mélanges de plus petite taille jusqu'à ce que l'animal infesté soit identifié.

Identification des larves : les larves L1, digérées et libérées des cellules musculaires, ont une taille approximative de 1 mm de long et un diamètre de 0,03 mm. La caractéristique la plus facile à distinguer dans les larves de *Trichinella* est le stichosome, qui consiste en une série de cellules discoïdes longeant l'œsophage et occupant la moitié antérieure du corps de la larve. Les larves de *Trichinella* peuvent apparaître enroulées (dans des conditions froides), mobiles (dans des conditions chaudes) ou en forme de « C » (larve morte). En cas de doute, les larves doivent être examinées à un grossissement plus fort et plus de tissus doit être testé. Si le nombre de larves est trop important, une dilution appropriée doit tout d'abord être effectuée.

Assurance qualité : les laboratoires utilisant les méthodes de digestion artificielle doivent maintenir un système de contrôle qualité convenable pour assurer une sensibilité de l'épreuve. Les composants d'un système d'assurance qualité sont décrits par la Commission Internationale de la Trichinellose (13) et dans d'autres références (9) et doivent comprendre l'organisation régulière de tests dans plusieurs laboratoires pour contrôler la compétence de ces derniers (7, 8).

b) Autres tests

- **Autres méthodes de détection directe**

- i) *Méthode des deux ampoules à décanter* : cette épreuve est recommandée comme alternative à la méthode de digestion communément utilisée (décrite ci-dessus) et est approuvée par l'Union Européenne à des fins d'exportation. La méthode a été conçue pour opérer dans des conditions strictes d'assurance qualité et pour minimiser les erreurs techniques ; elle a été amplement validée pour être utilisée sur les viandes de porc et de cheval (5). Elle comprend une digestion sur un agitateur magnétique et une sédimentation des larves sur une série d'ampoules à décanter. Le protocole prévoit moins d'étapes, prend moins de temps et ne nécessite pas d'étapes supplémentaires de clarification. Une étuve équipée de portes vitrées et réglée à 45 °C est utilisée pour la digestion. La digestion est réalisée dans 3 litres de liquide de digestion dans un cristalliseur sur un agitateur magnétique. Après digestion, la suspension est versée dans un flacon à décanter de 4 litres à travers un tamis à mailles de 177 à 180 µm, qui est rincé soigneusement avec de l'eau versée ensuite dans l'ampoule. La suspension est laissée reposer pendant 30 min et 125 ml sont transvasés dans une ampoule de 500 ml. Le volume est amené à 500 ml en ajoutant 375 ml d'eau du robinet, et la suspension qui en

résulte est laissée reposer encore 10 min. Finalement, 22 à 27 ml du sédiment sont retirés et transvasés dans une boîte de Petri et examinés pour la présence des larves comme décrit ci-dessus.

- ii) *La digestion mécaniquement assistée d'échantillons groupés/technique de sédimentation (Méthode 4 : 84/319/CEE)* : cette méthode utilise un mixeur Stomacher contrôlé thermiquement pour la phase de digestion et une ampoule à décantation pour la sédimentation des larves (3).
- iii) *Réaction d'amplification en chaîne par polymérase* : quelques études limitées ont montré que la PCR peut être utilisée pour détecter l'acide nucléique des larves dans les muscles des animaux infestés. Cependant, cette méthode manque de sensibilité et n'est pas pratique pour le dépistage en routine des animaux de rente. L'identification des espèces ou des génotypes de *Trichinella* obtenus à partir de tissu musculaire est utile pour la compréhension de l'épidémiologie du parasite chez les animaux, dans l'évaluation du risque pour la santé humaine et pour tracer les infestations jusqu'à la ferme d'origine. Des amorces spécifiques ont été développées qui permettent l'identification par PCR d'une seule larve prélevée dans des muscles jusqu'au niveau de l'espèce ou du génotype (25). Les demandes de spéciation ou génotypage de larves de *Trichinella* peuvent être faites auprès du Laboratoire de référence de l'OIE à Rome, Italie ou à Saskatoon, Canada (se reporter à la liste de la partie 3 de ce Manuel terrestre, www.iss.it/Trichinella/index.asp).

- **Méthodes de détection directe non recommandées pour l'inspection des viandes**

- i) *Trichinoscopie* : Cette méthode implique la compression de plusieurs fragments de tissu musculaire de 2 × 10 mm entre deux plaques de verre (compressorium) jusqu'à ce qu'ils deviennent translucides. Ils sont ensuite examinés pour la présence de larves à l'aide d'un microscope (2). Bien que cette méthode ait été utilisée pendant plusieurs décennies, elle nécessite beaucoup de travail et de nombreuses données comparatives démontrent qu'elle n'est pas aussi sensible que les épreuves de digestion (6). Augmenter la taille des échantillons pour compenser cet inconvénient n'est pas une solution pratique lorsqu'il faut tester un grand nombre d'animaux ; par ailleurs, les *Trichinella* non-encapsulées (*T. pseudospiralis*, *T. papuae* et *T. zimbabwensis*) peuvent apparaître non enroulées en dehors des cellules musculaires, ce qui les rend difficiles à détecter à l'aide d'un trichinoscope. En raison de ces limites, la trichinoscopie et les méthodes similaires de compression ne sont pas recommandées en examens de routine pour les carcasses.
- ii) *Trichomatic 35* : cette méthode comprend une chambre de digestion automatisée et une membrane de filtration pour la récupération et l'examen des larves. Les étapes critiques de la digestion et de la récupération sont difficiles à suivre dans ce système et la quantité testée n'est que de 35 g.

- **Méthodes immunologiques**

Une grande variété d'épreuves immunologiques ont été décrites pour le diagnostic de la trichinellose chez les animaux domestiques ou sauvages (17). Elles comprennent des épreuves d'immunofluorescence (IF), d'immuno-empreintes, de Western blot et des tests immunohistochimiques ou immuno-enzymatiques (ELISA). À l'exception de l'ELISA, ces épreuves ne sont pas normalisées et les réactifs ne sont pas disponibles pour un usage en routine. L'ICT a néanmoins publié un ensemble de recommandations pour le développement et l'utilisation des tests sérologiques pour la détection des anticorps circulants (17). L'ELISA est la seule épreuve immunologique avalisée par l'ICT. Elle n'est approuvée que comme outil de la surveillance épidémiologique pour la recherche des anticorps anti-*Trichinella* chez les porcs ; elle n'est pas fiable pour la détection de l'infestation des *Trichinella* chez un seul individu.

2. Épreuves sérologiques

Bien que d'autres tests sérologiques puissent avoir des applications pratiques, l'ELISA est reconnu en général comme l'épreuve de choix du fait de son faible coût, de sa fiabilité, de son adaptation aux bonnes pratiques d'assurance qualité, de la quantité croissante de données sur sa validation et de sa sensibilité et de sa spécificité qui sont bonnes quand le test est réalisé dans des conditions appropriées. Elle peut se révéler un outil pratique pour cribler des populations et est utilisée en routine dans les programmes de surveillance et les recherches lors de foyers. Néanmoins, pour les raisons expliquées ci-dessous, l'ELISA n'est pas recommandé pour le dépistage de la trichinellose chez le porc (au niveau d'un animal) dans le cadre du contrôle de la sécurité sanitaire des aliments.

a) Méthode immuno-enzymatique (ELISA)

- Sensibilité et spécificité

Des taux d'infestation aussi faibles que 1 larve/100 g de tissu sont détectés par ELISA chez les porcs (17). Cette sensibilité élevée fait des tests ELISA une méthode utile pour la détection de la transmission des infestations par *Trichinella* à la ferme ou pour des programmes de surveillance plus larges. Un inconvénient majeur de la sérologie pour le dépistage de l'infestation par *Trichinella* réside dans l'apparition de quelques résultats faux négatifs chez les animaux infestés. Ces résultats s'expliquent surtout par le délai d'apparition des anticorps chez les animaux après ingestion de larves infestantes. Des taux d'anticorps détectables ne sont pas présents chez les porcs avant 3 à 5 semaines après infestation (11, 14). Pour ces raisons, les épreuves sérologiques ne sont pas recommandées pour le dépistage individuel des carcasses. Les réponses sérologiques persistent longtemps après l'infestation sans diminution des titres, cependant, il a été rapporté que le titre d'anticorps diminue chez les chevaux en quelques mois après l'infestation (22). Les épreuves sérologiques ne présentent ainsi que peu d'intérêt pratique chez les chevaux car les titres d'anticorps chutent sous le seuil de détection malgré la présence de larves dans les muscles (19, 26). On connaît peu de chose sur la réponse en anticorps vis-à-vis de *Trichinella* chez le gibier, mais des sérums de bonne qualité sont essentiels pour diminuer les risques de réactions faussement positives.

- Échantillons

L'utilisation de l'ELISA pour détecter la présence d'anticorps spécifiques du parasite est une méthode rapide pouvant être réalisée sur du sérum, du sang ou des liquides tissulaires prélevés avant ou après abattage (15). La dilution à utiliser est différente selon qu'il s'agit de sérum ou de liquides tissulaires (23).

- Antigènes

La spécificité et la sensibilité de l'ELISA sont très dépendantes de la qualité de l'antigène utilisé dans le test. Les antigènes qui sont spécifiquement sécrétés par les stichocytes des larves L1 vivantes et présentant l'épitope carbohydraté TSL-1 sont les antigènes reconnus par les animaux infestés par *Trichinella*. Les antigènes reconnus dans les produits d'excrétion-sécrétion (ES) du vers sont un groupe de glycoprotéines étroitement apparentées ayant des poids moléculaires de 45 à 55 kDa (24). Un antigène carbohydraté synthétique (Tyvelose) a été utilisé dans les tests ELISA. Des études chez les porcs indiquent que la tyvelose est un aussi bon antigène que les produits ES dans la surveillance des porcs, mais néanmoins la sensibilité du test avec l'antigène synthétique est inférieure à celle du test avec l'antigène ES (4, 18). Des préparations d'antigènes ont été mises au point pour fournir une grande spécificité vis-à-vis de l'infestation à *Trichinella* chez le porc (16). Les antigènes ES de *T. spiralis* utilisés dans le test ELISA sont conservés dans toutes les espèces et génotypes de *Trichinella* (24) et peuvent, par conséquent, être utilisés pour la détection de l'infestation par l'une des 8 espèces chez les porcs ou les autres animaux.

- Production d'antigènes

Le diagnostic de la trichinellose par ELISA peut être réalisé en utilisant les antigènes de stichosome récoltés à partir des produits ES des larves de *Trichinella* maintenues en culture (16). À des fins de normalisation, il est recommandé que *T. spiralis* soit utilisée pour la production d'antigène pour le dépistage des animaux destinés à la consommation. Cependant, il a été démontré que les antigènes préparés avec n'importe quelle autre espèce de *Trichinella* peuvent être utilisés pour la détection des anticorps des animaux infestés indépendamment de l'espèce infestante (20). Les parasites destinés à la préparation d'antigène sont maintenus par passage successifs sur des souris ou des rats.

Afin de préparer cet antigène pour les tests ELISA (16), le stade L1 musculaire de *T. spiralis* (T-1) est préparé à partir d'une carcasse de rat ou de souris infesté, éviscéré et dépecé ; la carcasse est hachée puis est digérée dans une solution de pepsine à 1 % en présence d'HCl à 1 % pendant 30 min à 37 °C (comme décrit précédemment). Les larves sont lavées (3 fois, 20 min) dans un milieu de Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) additionné de pénicilline (500 unités/ml) et de streptomycine (500 unités/ml), puis sont ajustées à une densité de 5 000 L1/ml, dans du milieu DMEM supplémenté avec de l'HEPES [(N-2-hydroxyéthylpipérazine, acide N-2-éthanésulphonique) (10 mM), de la glutamine (2 mM), du pyruvate (1 mM), de la pénicilline (250 unités/ml) et de la streptomycine (250 µg/ml) (DMEM complet)] à 37 °C dans une atmosphère contenant 10 % de CO₂. Le milieu de culture est collecté après 18 à 20 h et les larves sont séparées par filtration. Le surnageant est concentré sous pression en utilisant une membrane ayant un seuil de coupure de 5 000 Da de poids moléculaire. Les antigènes de sécrétion/excrétion (ES) ainsi concentrés peuvent être conservés pendant de courtes périodes à -20 °C ou plus longtemps à -70 °C ; environ 25 composants protéiques ont pu être mis en évidence par électrophorèse dénaturante en présence de SDS (dodécyl sulfate de sodium) à travers un gel de polyacrylamide. Beaucoup d'entre-eux portent l'épitope antigénique carbohydraté TSL-1.

La pureté de l'antigène est essentielle pour la spécificité de l'ELISA. Des mesures doivent être prises pour contrôler une éventuelle croissance bactérienne soit visuellement, en microscopie en contraste de phase, soit en déposant un échantillon du milieu sur une gélose. Les cultures présentant une contamination bactérienne doivent être éliminées. Les larves ne doivent pas être maintenues au delà de 18 h ; la détérioration des larves après ce délai contribue à la libération d'antigènes somatiques qui réduisent la spécificité du test. L'antigène, préparé comme décrit, doit présenter un rapport de l'absorbance > 1,0 280 : 260 nm. Les antigènes obtenus par le maintien *in vitro* des larves de *Trichinella* doivent être testés avant utilisation contre un ensemble de sérum identifiés comme positifs et négatifs.

- **Protocole**

Un exemple de la méthode ELISA pour le diagnostic de la trichinellose des porcs est décrit ci-dessous. Il est essentiel que tous les réactifs utilisés dans le test soient normalisés et ajustés à la concentration optimale pour obtenir le meilleur résultat. Des valeurs usuelles sont données à titre d'exemple.

- i) Sensibiliser les puits d'une plaque 96 puits de microtitrage avec 100 µl/puits de l'antigène ES de *T. spiralis*, dilué à la concentration de 5 µg/ml dans le tampon de saturation (tampon carbonate/bicarbonate 50 mM, pH 9,6). La saturation est obtenue pendant 60 min à 37 °C ou une nuit à 4 °C.
- ii) Laver 3 fois les puits de la plaque avec le tampon de lavage contenant du Tris 50 mM, pH 7,4, 150 mM de NaCl, du lait écrémé en poudre à 5 % et du Triton X-100 à 1 %. Les plaques sont séchées après le lavage en les retournant sur un papier absorbant.
- iii) Diluer les sérums de porc au 1/50 ou 1/100 dans le tampon de lavage. D'autres sources d'anticorps comme le sang ou le fluide musculaire peuvent être utilisées à la place du sérum aux dilutions de 1/5 ou 1/10 (23). Ajouter 100 µl de sérum dilué de porc aux puits recouverts par l'antigène. Des témoins sérums positif et négatif doivent être utilisés sur chaque plaque aux mêmes dilutions que celles des sérums testés. Incuber à la température du laboratoire pendant 30 min.
- iv) Laver les puits 3 fois comme à l'étape ii).
- v) Ajouter 100 µl/puits d'une IgG de lapin anti-porc (0,1 mg/ml) couplée à la peroxydase diluée au 1/1 000 dans le tampon de lavage produite par *Kirkegaard and Perry Laboratories*, Gaithersburg, Maryland, États-Unis d'Amérique. Incuber à la température du laboratoire pendant 30 min.
- vi) Laver les puits 3 fois comme à l'étape ii). Rincer une fois avec de l'eau distillée.
- vii) Ajouter 100 µl du substrat peroxydase approprié (par exemple: acide 5'-aminosalicylique [0,8 mg/ml] avec 0,005 % de peroxyde d'hydrogène, pH 5,6-6,0).
- viii) Lire les plaques après 5-15 min en calculant la densité optique à 450 nm en utilisant un lecteur de plaque automatique. Les valeurs égales en ELISA à au moins 4 fois la valeur du mélange de sérums normaux sont considérées comme positives. Seront classés comme suspects les titres atteignant 3 fois la valeur des sérums normaux.

Des adaptations commerciales de l'ELISA sont disponibles dans un petit format, nécessitant moins de 1 h de réalisation. Le fabricant doit valider le kit de diagnostic avant la mise sur le marché et l'utilisateur doit, avant son utilisation, évaluer les performances du kit avec des échantillons négatifs et positifs de référence.

Le test doit être réalisé dans un environnement dans lequel les normes internationalement reconnues de gestion de la qualité, comme l'ISO 17025, sont mis en œuvre.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'existe pas de vaccin contre la trichinellose pour les animaux de rente ou le gibier. Il n'y a pas besoin de produits biologiques pour la méthode de détection directe. Pour les méthodes immunologiques applicables, l'emploi des antigènes TSL-1 est recommandé pour optimiser la spécificité de l'épreuve. Ces antigènes peuvent être obtenus comme produits d'excrétion-sécrétion issus du maintien *in vitro* de larves musculaires comme cela est décrit précédemment.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BOIREAU P., VALLEE I., ROMAN T., PERRET C., MINGYUAN L., GAMBLE H.R. & GAJADHAR A. (2000). *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk. *Vet. Parasitol.*, **93**, 309–320.
2. EUROPEAN ECONOMIC COMMUNITY (1977). Commission Directive 77/96/EEC. *Off. J. European Communities*, **26**, 67–77.
3. EUROPEAN COMMISSION (2005). Commission Regulation (EC) No. 2075. *Off. J. European Union*, **338**, 60–82.
4. FORBES L.B., APPELYARD G.D. & GAJADHAR A.A. (2004). Comparison of synthetic tyvelose antigen with excretory-secretory antigen for the detection of trichinellosis in swine using enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Parasitol.*, **90**, 835–840.
5. FORBES L.B. & GAJADHAR A.A. (1999). A validated *Trichinella* digestion assay and an associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horse meat. *J. Food Prot.*, **62**, 1308–1313.
6. FORBES L.B., PARKER S. & SCANDRETT W.B. (2003). Comparison of a modified digestion assay with trichinoscopy for the detection of *Trichinella* larvae in pork. *J. Food Prot.*, **66**, 1043–1046.
7. FORBES L.B., RAJIC A. & GAJADHAR A.A. (1998). Proficiency samples for quality assurance in *Trichinella* digestion tests. *J. Food Prot.*, **61**, 1396–1399.
8. FORBES L.B., SCANDRETT W.S. & GAJADHAR A.A. (2005). A program to accredit laboratories for reliable testing of pork and horsemeat for *Trichinella*. *Vet. Parasitol.*, **132**, 173–177.
9. GAJADHAR A.A. & FORBES L.B. (2001). An internationally recognized quality assurance system for diagnostic parasitology in animal health and food safety with example data on trichinellosis. *Vet. Parasitol.*, **103**, 133–140.
10. GAJADHAR A.A., SCANDRETT W.B. & FORBES L.B. (2006). Overview of food- and water-borne zoonotic parasites at the farm level. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **25** (2), 595–606.
11. GAMBLE H.R. (1996). Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. *J. Food Prot.*, **59**, 295–298.
12. GAMBLE H.R. (1997). Parasites associated with pork and pork products. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **16**, 496–506.
13. GAMBLE H.R., BESSONOV A.S., CUPERLOVIC K., GAJADHAR A.A., VAN KNAPEN F., NOECKLER K., SCHENONE H. & ZHU X. (2000). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Vet. Parasitol.*, **93**, 393–408.
14. GAMBLE H.R., GAJADHAR A.A. & SOLOMON M.B. (1996). Methods for the detection of trichinellosis in horses. *J. Food Prot.*, **59**, 420–425.
15. GAMBLE H.R. & PATRASCU I.V. (1996). Whole blood, serum, and tissue fluids in an enzyme immunoassay for swine trichinellosis. *J. Food Prot.*, **59**, 1213–1217.
16. GAMBLE H.R., RAPIC D., MARINCULIC A. & MURRELL K.D. (1988). Evaluation of excretory-secretory antigens for the serodiagnosis of swine trichinellosis. *Vet. Parasitol.*, **30**, 131–137.
17. GAMBLE H.R., POZIO E., BRUSCHI F., NÖCKLER K., KAPEL C.M.O. & GAJADHAR A.A. (2004). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on the Use of Serological Tests for the Detection of *Trichinella* Infection in Animals and Man. *Parasite*, **11**, 3–13.
18. GAMBLE H.R., WISNEWSKI N., & WASSOM D. (1997). Detection of trichinellosis in swine by enzyme immunoassay using a synthetic glycan antigen. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 417–421.
19. HILL D.E., FORBES L.B., KRAMER M., GAJADHAR A.A. & GAMBLE H.R. (2007). Larval viability and serological response in horses with long-term infection of *Trichinella spiralis*. *Vet. Parasit.*, **146**, 107–116.
20. KAPEL C.M.O. & GAMBLE H.R. (2000). Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *Int. J. Parasitol.*, **30**, 215–221.

21. MURRELL K.D., LICHTENFELS J.R., ZARLENGA D.S. & POZIO E. (2000). The systematics of the genus *Trichinella* with a key to species. *Vet. Parasitol.*, **93**, 293–307.
22. NOCKLER K., POZIO E., VOIGT W.P. & HEIDRICH J. (2000). Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Vet. Parasitol.*, **93**, 335–350.
23. NOCKLER K., SERRANO F.J., BOIREAU P., KAPEL C.M. & POZIO E. (2005). Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Vet. Parasitol.* **132**, 85–90.
24. ORTEGA-PIERRES M.G., YEPEZ-MULIA L., HOMAN W., GAMBLE H.R., LIM P., TAKAHASHI Y., WASSON D.L. & APPLETON J.A. (1996). Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: A platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunol.*, **18**, 273–284.
25. POZIO E. & LA ROSA G. (2003). PCR-derived methods for the identification of *Trichinella* parasites from animal and human samples. *Methods Mol. Biol.*, **216**, 299–309.
26. POZIO E., SOFRONIC-MILOSAVLJEVIC L., GOMEZ MORALES M.A., BOIREAU P. & NÖCKLER K. (2002). Evaluation of ELISA and Western blot analyses using three antigens to detect anti-*Trichinella* IgG in horses. *Vet. Parasitol.*, **108**, 163–178.
27. POZIO E. & ZARLENGA D.S. (2005). Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Int. J. Parasitol.*, **35**, 1191–1204.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la trichinellose (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

INFECTIONS À *TRYPANOSOMA EVANSI* (Y COMPRIS LE SURRA)

RÉSUMÉ

Définition de la maladie : *Trypanosoma evansi* cause une maladie connue sous le nom de trypanosomose¹ (« surra »), qui atteint un grand nombre d'animaux domestiques d'Asie, d'Afrique, d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud. Les principales espèces-hôtes affectées varient du point de vue géographique, mais les buffles, les bovins, les camélidés et les chevaux sont particulièrement atteints, bien que d'autres animaux, y compris des animaux sauvages, soient également réceptifs. C'est une maladie transmise par des arthropodes. Plusieurs espèces d'insectes hématophages, y compris les espèces des genres *Tabanus* et *Musca* sont impliquées dans la transmission mécanique de l'infection ; au Brésil, les chauves-souris vampires ont été incriminées dans la transmission.

Description de la maladie : chez les animaux réceptifs, la maladie se manifeste par de l'hyperthermie, directement associée à de la parasitémie ainsi qu'à une anémie progressive. Des épisodes récurrents de fièvre et de parasitémie surviennent au décours de la maladie. De l'œdème, particulièrement dans les parties déclives du corps, des plaques urticariennes et des pétéchies des séreuses sont souvent observés. Des avortements ont été rapportés chez des buffles et des camélidés. Il y a des indications selon lesquelles la maladie provoque une immunodéficience.

Identification de l'agent pathogène : les symptômes généraux de l'infection à *T. evansi* ne sont pas suffisamment caractéristiques pour le diagnostic. Des épreuves au laboratoire sont nécessaires. L'examen de sang pose problème car les trypanosomes ne peuvent être détectés que lors de parasitémie élevée. Dans ces conditions, l'examen d'étalements de sang, de frottis sanguins après coloration ou de suc ganglionnaire peut mettre en évidence les trypanosomes. Dans d'autres cas, plus chroniques, tel que l'état de porteur, l'examen de gouttes épaisses ainsi que des méthodes de concentration des parasites et l'inoculation aux animaux de laboratoire sont recommandés. .

Épreuves sérologiques : l'infection induit des réponses spécifiques d'anticorps, aussi une variété d'épreuves de détection des anticorps a-t-elle été proposée pour utilisation sur le terrain ou au laboratoire. Certaines de ces épreuves ont été partiellement validées, mais elles attendent une évaluation à grande échelle et une normalisation. Parmi les épreuves couramment utilisées au laboratoire, on trouve les tests immunoenzymatiques, les tests d'agglutination sur carte et les tests d'agglutination avec des billes de latex. Les tests d'agglutination sur carte (CATT) pour *T. evansi* et les tests d'agglutination avec des billes de latex sont utilisables sur le terrain, un test individuel (test pen side) n'est toujours pas disponible. Les épreuves pour la détection des anticorps circulants sont de grande valeur. Les estimations des valeurs prédictives des différentes épreuves sérologiques indiquent que les tests ELISA pour la détection des anticorps IgG conviennent mieux pour regrouper correctement les animaux non-infectés et conviennent donc mieux pour regrouper les animaux vraiment infectés. Un ELISA, détectant les IgG, serait ainsi bien adapté pour vérifier que les animaux sont indemnes d'infection avant leur expédition ou leur introduction en quarantaine. Dans des situations où une maladie apparente existe, les tests CATT peuvent être

¹ Nomenclature des maladies parasitaires : voir la note dans le Chapitre 2.4.18., « Trypanosomoses » (transmises par les glossines).

utilisés pour repérer les individus avant traitement par des trypanocides. Pour déclaration de l'état indemne de maladie, une série d'épreuves – d'abord par ELISA suivi d'un nouveau test par le CATT pour les prélèvements suspects – est recommandée. Il faut cependant souligner qu'il y a des similitudes antigéniques considérables parmi les différentes espèces de trypanosomes pathogènes, d'où l'apparition de réactions croisées possibles avec n'importe quelle épreuve sérologique dans les zones où existent des trypanosomoses transmises par les glossines.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : il n'existe pas de vaccin contre la maladie.

A. INTRODUCTION

Les symptômes du Surra, la maladie causée par *Trypanosoma evansi* fournissent des indications, mais ne sont pas suffisamment pathognomoniques et le diagnostic doit être confirmé par des méthodes de laboratoire. Chez les animaux réceptifs, qui comprennent les bovins, les buffles, les camélidés (dromadaires et chameaux bactriens), les chevaux, les porcs, les moutons et les chèvres, la maladie se manifeste par de l'hyperthermie, directement associée à la parasitémie ainsi qu'à une anémie progressive, une asthénie et de la lassitude. Des épisodes récurrents de fièvre et de parasitémie surviennent au décours de la maladie. De l'œdème, particulièrement des parties inférieures du corps, des plaques urticariennes et des pétéchies des séreuses sont souvent observées. Des avortements ont été rapportés chez les buffles et les camélidés (8, 17). Il existe des indications selon lesquelles la maladie provoque une immunodéficience (5, 21).

Il existe une variation considérable de la pathogénicité des différentes souches de *T. evansi* et de la réceptivité des différentes espèces-hôtes de la maladie. La maladie peut revêtir une forme aiguë ou chronique et, dans ce dernier cas, elle peut persister pendant de nombreux mois. La maladie est souvent fatale chez les camélidés, les buffles, les chevaux, les bovins, les lamas et les chiens, mais des infections bénignes ou sub-cliniques peuvent aussi survenir chez ces espèces. Les animaux sauvages comme les cervidés et les cabiais peuvent être infectés. Les animaux soumis à des stress (malnutrition, gravidité, travail) sont plus sensibles à la maladie.

Biologiquement *T. evansi* ressemble beaucoup à *T. equiperdum*, agent causal de la dourine (2). Morphologiquement, il ressemble aux formes allongées des trypanosomes transmis par les glossines : *T. brucei*, *T. gambiense* et *T. rhodesiense*. La caractérisation moléculaire indique que les diverses souches de *T. evansi* isolées en Asie, en Afrique et en Amérique du Sud ont une origine unique. La caractérisation moléculaire utilisant les techniques d'amplification au hasard de l'ADN polymorphique et de fingerprinting après clivage par des endonucléases montrent que les isolats de *T. evansi* et de *T. equiperdum* forment un groupe homogène. Cela pourrait s'expliquer par le fait que *T. equiperdum* ne serait pas une espèce en soi et que l'expression clinique de la maladie dépend en premier lieu de la réponse immunitaire de l'hôte. Comme tous les trypanosomes pathogènes, *T. evansi* est recouvert d'une couche protéique dense constituée d'une seule protéine appelée « glycoprotéine variable de surface ». Celle-ci agit comme un immunogène majeur et entraîne la formation des anticorps spécifiques. Les parasites sont capables d'échapper aux conséquences de ces réactions immunes en modifiant leur glycoprotéine variable de surface, phénomène connu sous le nom de variation antigénique.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Les méthodes classiques directes de parasitologie pour le diagnostic des trypanosomoses, à savoir l'examen de sang ou de suc ganglionnaire, ne sont pas hautement sensibles. Dans les régions où d'autres *Trypanozoon spp.* co-existent avec *T. evansi*, l'identification spécifique par le seul examen microscopique est impossible. Des sondes d'ADN spécifiques (19, 24) peuvent permettre l'identification des espèces de trypanosomes par hybridation d'ADN non radioactif. Une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) basée sur l'antigène spécifique de *T. evansi* (RoTat 1.2 VSG) a été mise au point, mais n'est pas encore validée sur le terrain (3).

• Méthodes directes

a) Méthodes utilisées couramment sur le terrain

i) Prélèvements sanguins

Trypanosoma evansi est un parasite du sang et des tissus qui colonise souvent les vaisseaux sanguins profonds dans le cas de faible parasitémie. Pour cette raison, il est recommandé de prélever

le sang destiné au diagnostic à la fois dans les vaisseaux superficiels et profonds. Il faut cependant bien comprendre que moins de 50 % des animaux infectés ne pourront être identifiés que par l'examen du sang périphérique.

Pour obtenir du sang périphérique il convient de ponctionner une petite veine de l'oreille ou de la queue. Les échantillons plus importants sont prélevés au niveau d'une grosse veine à l'aide d'une seringue. Nettoyer à l'alcool une zone au bord de l'oreille ou au bout de la queue puis, après séchage, ponctionner une veine avec un instrument adapté. Vérifier que les instruments sont stérilisés entre deux animaux ou que des instruments à usage unique sont utilisés, afin de ne pas transmettre l'infection par du sang résiduel.

ii) *Examen du sang à l'état frais*

Une petite goutte de sang est déposée sur une lame propre et recouverte d'une lamelle pour étaler le sang en couche monocellulaire. L'examen est alors pratiqué au microscope optique ($\times 200$) pour détecter toute motilité de trypanosome.

iii) *Goutte épaisse colorée*

Une grosse goutte de sang est déposée sur une lame et étalée avec un cure-dent ou avec le coin d'une autre lame pour former une zone de 1 à 1,25 cm de diamètre. Laisser sécher à l'air pendant 1 h ou plus à l'abri des insectes. La préparation est alors colorée au Giemsa (1 goutte de Giemsa commercial + 1 ml de solution physiologique tamponnée au phosphate [PBS, 2,4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,54 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,34 g de NaCl], pH 7,2), pendant 25 min. Après lavage, les lames sont examinées au microscope optique à fort grossissement ($\times 500$ à 1 000). L'avantage de la technique de la goutte épaisse est qu'elle permet de concentrer le sang sur une petite surface et qu'elle nécessite ainsi moins de temps pour détecter les parasites. Son désavantage est que les trypanosomes peuvent être altérés au cours de la manipulation et que, de ce fait, elle ne peut convenir à la différenciation des espèces en cas d'infections mixtes.

iv) *Frottis sanguins colorés*

Une goutte de sang est déposée à 20 mm d'une extrémité d'une lame propre et un film mince est obtenu par étirement classique. Ce film est brièvement séché à l'air, fixé à l'alcool méthylique pendant 2 min et laissé au sec. Les frottis sont alors colorés au Giemsa (1 goutte de Giemsa + 1 ml de PBS de pH 7,2), pendant 25 min. La préparation est égouttée, la lame est lavée à l'eau du robinet et séchée. Les frottis non fixés peuvent être colorés en les recouvrant de May-Grunwald pendant 2 min puis en ajoutant un volume égal de PBS à pH 7,2 et en laissant agir pendant 3 min. La préparation est égouttée et l'on y ajoute du Giemsa en laissant agir pendant 25 min. On égoutte à nouveau et les lames sont lavées à l'eau du robinet puis séchées. Elles sont alors examinées à un fort grossissement ($\times 400$ à 1 000). Cette technique permet des études morphologiques détaillées et l'identification des espèces de trypanosomes. Des techniques de coloration rapide existent également (Coloration de Field, Diff Quick®).

v) *Biopsies des nœuds lymphatiques*

D'habitude les prélèvements proviennent des nœuds lymphatiques préscapulaires ou précuraux (sous-iliaques). Un nœud lymphatique est choisi par palpation et le lieu de prélèvement est nettoyé à l'alcool. Le nœud est ponctionné avec une aiguille-trocart d'un calibre convenable et son contenu est aspiré dans la seringue. Ce contenu est alors déposé sur une lame, recouvert d'une lamelle et examiné comme les préparations de sang frais. Après fixation, les frottis peuvent aussi être conservés pour examens ultérieurs.

b) Méthodes de concentration

Chez la plupart des hôtes qu'il infecte, *T. evansi* peut induire des infections cliniques bénignes ou des états de porteurs sub-cliniques avec de faibles parasitémies, rendant difficile la mise en évidence des parasites. Dans ces conditions, des méthodes de concentration deviennent nécessaires.

i) *Centrifugation de l'hématocrite*

Recueillir le sang (70 μl) dans au moins deux tubes capillaires héparinés (75 \times 1,5 mm). Les sceller à l'extrémité sèche à la chaleur, et centrifuger, extrémité scellée vers le bas, à 3 000 **g** pendant 10 min. Placer le tube capillaire entre deux morceaux de verre (25 \times 10 \times 1,2 mm) collés sur une lame. Une lamelle peut être placée au niveau de l'interface du caillot leucocyto-plaquettaire/plasma (buffy coat) où les trypanosomes sont concentrés. L'espace autour de cette partie du tube est rincé à l'eau ou recouvert d'huile à immersion, et l'interface est examinée sous le microscope ($\times 100$ à 200). Cette technique peut détecter environ 400 trypanosomes/ml. Une autre méthode plus simple consiste à seulement déposer une goutte d'huile à immersion sur le tube capillaire et à l'examiner après s'être assuré qu'il y a contact entre l'objectif et l'huile à immersion.

- ii) Technique d'examen sur fond noir et en contraste de phase du caillot leucocyto-plaquettaire/plasma (buffy coat).

Recueillir et centrifuger le sang dans des tubes capillaires héparinés comme précédemment. Sectionner le tube avec un diamant, 1 mm au-dessous de la couche leucocyto-plaquettaire - la partie supérieure contient ainsi la couche des hématies (H), le caillot (leucocytes et plaquettes) et un peu de plasma.

Déposer partiellement l'ensemble de ces éléments sur une lame ; recouvrir d'une lamelle et examiner sur fond noir, en contraste de phase ou en éclairage ordinaire.

Une alternative à l'hématocrite obtenu avec une centrifugeuse électrique est l'utilisation de micro-centrifugeuses à main qui ont été employées avec succès pour la détection de la trypanosomose des bovins et des camélidés (9, 14).

- iii) *Techniques d'hémolyse*

Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) peut être utilisé comme un réactif afin d'hémolyser les hématies pour faciliter la détection des trypanosomes mobiles dans les prélèvements de sang provenant d'animaux parasités. Comme le SDS est toxique, le contact avec la peau, ainsi que son ingestion et son inhalation doivent être évités. La solution de SDS peut être conservée pendant plusieurs mois à la température ambiante. Aussi bien la solution de SDS que les prélèvements de sang doivent être utilisés à une température supérieure à 15 °C. À des températures inférieures, les trypanosomes peuvent être détruits.

Deux procédés généraux, la clarification des étalements de sang frais et la centrifugation après hémolyse peuvent être employés² :

- *Méthode de clarification des étalements de sang frais*

Cette méthode met en œuvre la lyse partielle des hématies pour faciliter la détection des trypanosomes mobiles. La méthode requiert une solution de SDS : 1 % de SDS dissout dans un soluté physiologique Tris/glucose de pH 7,5, anses à inoculation (10 µl), des lames et des lamelles (24 × 24 mm) et une goutte de sang frais fluide ou hépariné. Dissoudre 100 mg de SDS dans 100 ml de tampon isotonique de Tris/NaCl/glucose de pH 7,5 (Trizma base 14 g, NaCl 3,8 g, glucose 10,8 g ; dissoudre les produits chimiques dans 750 ml d'eau distillée, ajouter 90 à 100 ml de 1 N HCl et ajuster à pH 7,5 puis porter au volume final de 1 000 ml avec de l'eau distillée). Ce tampon peut être conservé en petits flacons à température ambiante pendant plusieurs mois. Le test ne doit pas donner une sensibilité significativement plus élevée que la technique de l'étalement de sang frais. De plus, le SDS peut poser des problèmes pour la mise au point du microscope et les mouvements des trypanosomes peuvent être sévèrement restreints du fait de la viscosité du SDS.

Verser approximativement 10 µl de sang sur une lame. Ajouter 10 µl de solution de SDS en utilisant une anse à inoculation et agiter doucement. Appliquer une lamelle. Examiner la préparation sans délai à faible grossissement (× 100 ou × 200).

- *Technique de centrifugation après hémolyse*

Ce procédé requiert une lyse presque complète des hématies. Le matériel nécessaire pour sa réalisation comprend : une solution de SDS (0,1 % de SDS dissout en solution physiologique de Tris/glucose à pH 7,5), des tubes à centrifugation coniques, des tubes à essai ordinaires, de longues et fines pipettes à ballonnets en plastique, des lames, des lamelles (24 × 24 mm ou 24 × 32 mm) et du sang hépariné.

Avec une pipette ou une seringue, transférer 9 volumes (maximum 6,3 ml) de la solution de SDS dans un tube à essai ordinaire. Aspirer un volume (maximum 0,7 ml) de sang hépariné dans une pipette à ballonnet et le déposer juste au-dessus de la surface de la solution de SDS, mélanger rapidement et complètement. Éviter la formation d'écume qui pourrait entraîner la destruction des trypanosomes. Attendre 10 min pour obtenir une hémolyse complète.

Verser la suspension hémolysée dans un tube conique à centrifugation et centrifuger à environ 500 g pendant 10 min. Avec une pipette à ballonnet propre, enlever le maximum de surnageant sans toucher au sédiment. Avec une fine pipette à ballonnet très effilée, enlever un peu plus de surnageant en laissant au fond 10 à 20 µl du sédiment qui n'a pas été touché.

² Toutes les instructions et le matériel nécessaires peuvent être obtenus auprès de l'Institut de Médecine Tropicale, laboratoire de sérologie, Nationalestraat 155, B-2000 Anvers, Belgique.

Très soigneusement, récolter tout le sédiment et le déposer sur une lame de microscope. Appliquer une lamelle et examiner la préparation tout entière sans délai à faible grossissement ($\times 100$ ou $\times 200$).

iv) *Technique de centrifugation en mini-échangeuse d'anions*

Lorsqu'un prélèvement de sang provenant d'animaux infectés par des trypanosomes salivaires est passé à travers une colonne échangeuse d'anions appropriée, les cellules sanguines de l'hôte infecté, étant chargées plus négativement que les trypanosomes, sont adsorbées dans l'échangeur d'anions, alors que les trypanosomes sont élués, en gardant viabilité et infectivité (15). Une méthode simplifiée, destinée à être appliquée sur le terrain, a été développée pour la détection des faibles parasitémiés (26). La sensibilité de cette technique peut être augmentée d'environ 10 fois en utilisant des préparations de caillot leucocyto-plaquettaire (buffy coat) plutôt que le sang total (25).

- *Préparation du soluté physiologique de tampon phosphate glucose à pH 8*

Na_2HPO_4 (anhydre) (13,48 g) ; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,78 g) ; NaCl (4,25 g) ; eau distillée (1 litre).

Des solutions de forces ioniques diverses sont préparées en diluant le tampon phosphate stock de pH 8 et en y ajoutant du glucose pour maintenir une concentration convenable. Pour le sang de souris, de ruminants domestiques et sauvages et de chien, ajouter 4 parties de tampon phosphate à 6 parties d'eau distillée et ajuster à une concentration finale de glucose de 1 %. Pour le sang de porc et de lapin, ajouter 3 parties de tampon phosphate à 7 parties d'eau distillée et ajuster la concentration en glucose à 1,5 %. La solution de PBS / glucose (PSG) doit être stérile.

- *Équilibrage de la colonne de DEAE-cellulose*

Mettre en suspension 500 g de DEAE-cellulose (diéthylamino-éthylcellulose) dans 2 litres d'eau distillée. Ajuster le pH à 8 avec de l'acide phosphorique. Laisser agir pendant 30 min. Éliminer le liquide surnageant contenant de fins granules. Répéter 3 fois l'opération. Conserver la suspension équilibrée et concentrée de DEAE-cellulose (suspension épaisse) à 4 °C ou en petites fractions aliquotes à -20 °C.

- *Remplissage de la colonne de DEAE-cellulose*

Une seringue de 2 ml sans son piston est placée sur un porte-tube à essai avec son aiguille (20 G \times 1,5 inch = 3,81 cm). Un disque de papier filtre Whatman N°41 est placé au fond de la seringue et humidifié en ajoutant quelques gouttes de PSG. Verser 2 à 2,5 ml de la suspension épaisse, provenant de la cellulose équilibrée, dans la seringue et faire sédimenter par élution du tampon. La hauteur du sédiment doit être approximativement de 3 cm. Laver et équilibrer la colonne avec 2 ml de PSG sans altérer la surface.

- *Adsorption de l'éluat sanguin des trypanosomes*

Déposer doucement 100 à 300 μl de sang hépariné au-dessus de la surface de la colonne de cellulose. Ajouter 10 gouttes de PSG et éliminer les 10 premières gouttes de l'éluat. Ajouter progressivement 1,5 ml de PSG et commencer à recueillir l'éluat dans une fine pipette Pasteur scellée à une extrémité. Mettre la pipette ainsi emplie et protégée par un capuchon de pipette en plastique, dans un tube et centrifuger à 525 *g* (ou jusqu'à 1 000 *g*) pendant 10 min. Examiner le fond de la pipette au microscope ($\times 100$ ou $\times 200$) en utilisant un dispositif spécial de montage. Autrement, l'éluat pourrait être recueilli dans des tubes plastiques de 50 ml à fonds coniques, centrifugé à 1 000 *g* et le sédiment examiné en microscopie à fond noir.

La colonne de cellulose doit rester constamment humide pendant la manipulation.

c) *Inoculation à l'animal*

Les animaux de laboratoire peuvent être utilisés pour révéler les infections subcliniques (non patentées) des animaux domestiques. *Trypanosoma evansi* possède un large spectre d'infectivité pour les petits rongeurs et c'est ainsi que les rats et les souris sont souvent utilisés. L'inoculation aux rongeurs n'est une méthode sensible à 100 % (18), mais des améliorations peuvent être obtenues en utilisant la fraction leucocytaire. Une telle procédure a permis de détecter jusqu'à 1,25 *T. evansi* par ml de sang (25).

Le sang traité par l'anticoagulant sodique hépariné est inoculé par voie intrapéritonéale à des rats (1 à 2 ml) ou à des souris (0,25 à 0,5 ml). L'inoculation d'au moins deux animaux est recommandée : le sang est prélevé à la queue 3 fois par semaine pour détecter la parasitémie. La période d'incubation avant l'apparition des parasites et leur virulence dépendent des souches de trypanosomes, de leur concentration dans l'inoculum et de la souche des animaux de laboratoire inoculés. On peut peut-être augmenter la sensibilité de ce système de culture *in vivo* en utilisant des animaux de laboratoire en immunosuppression.

Des médicaments comme la cyclophosphamide ou l'acétate d'hydrocortisone ou bien l'irradiation par les rayons X ou la splénectomie sont utilisés à cette fin.

d) Sondes d'ADN recombinée

Des sondes d'ADN pour détecter les trypanosomes dans les tissus ou le sang infectés ont été utilisées pour détecter les trypanosomes dans du sang ou des tissus infectés, mais elles ne sont pas employées en routine (28, 31). Bien que les techniques moléculaires aient potentiellement une sensibilité élevée, peu d'études convaincantes ont été publiées, qui évaluent la sensibilité diagnostique de ces méthodes comparées à d'autres techniques telle que la sérologie.

e) Détection de l'ADN trypanosomien

La détection de quantités infimes d'ADN trypanosomien par une épreuve de PCR est un moyen de dépister les animaux ayant une infection en cours, qui pourrait avoir la sensibilité et la spécificité requises (3, 20, 32). Des expériences sur des buffles (10) ont montré que la sensibilité diagnostique de la PCR était seulement de 78 %, ce qui est similaire à celle de l'inoculation à la souris.

• **Méthodes indirectes**

Ces méthodes comprennent des tests qui mettent en évidence les effets du parasite sur l'hôte qu'il infecte plutôt que la détection du parasite lui-même.

a) Hématologie

L'anémie est habituellement un indicateur fiable de l'infection trypanosomienne, bien qu'elle ne soit pas en elle-même pathognomonique. Toutefois, les animaux qui ont une infection sub-clinique bénigne peuvent être parasitémiqes sans manifester d'anémie (4).

L'anémie peut être estimée en mesurant l'hématocrite et être alors utilisée pour des enquêtes de troupeaux à risque. La technique à employer est celle de la centrifugation de l'hématocrite. Le tube capillaire est examiné et les résultats sont exprimés en pourcentage du culot d'hématies par rapport au volume de sang total.

2. Épreuves sérologiques

Historiquement, de nombreuses méthodes ont été utilisées pour déceler les anticorps humoraux induits par les antigènes trypanosomiens mais plus récemment, la tendance est de se concentrer sur des techniques plus faciles à normaliser telles que la technique ELISA (5, 7, 12, 16, 22, 23, 24, 27), les tests d'agglutination sur carte (CATT) (1, 20, 24) et les tests d'agglutination avec des billes de latex (11, 16). Une large évaluation de l'ELISA et du CATT a été réalisée chez les buffles en Indonésie et au Vietnam (6, 11, 29). Le recueil des prélèvements peut être simplifié en déposant du sang sur papier filtre pour usage ultérieur avec ELISA, tandis que, pour le CATT, le sang entier peut être substitué au sérum (11). D'autres modifications innovantes pourraient être développées à l'avenir ; l'une d'entre elles serait, par exemple, un test sur tigelette en milieu colloïdal coloré (13) qui pourrait permettre l'utilisation sur le terrain. Il est d'une extrême importance que les tests sérologiques soient validés et normalisés si l'on veut qu'ils soient utilisés pour identifier de façon correcte les animaux infectés. Cela sous-entend que des critères normalisés pour l'interprétation des résultats ont été établis pour chaque espèce animale, ainsi que pour chaque laboratoire appliquant la méthode.

b) Méthode immuno-enzymatique

Le principe de cette technique est que les anticorps spécifiques des trypanosomes peuvent être détectés par des enzymes liées à des anti-immunoglobulines en utilisant des plaques de polystyrène en phase solide recouvertes d'antigène soluble. L'enzyme peut être la peroxydase, la phosphatase alcaline ou toute autre enzyme convenable. Le conjugué d'enzyme se lie au complexe antigène/anticorps et réagit alors, avec un substrat convenable, pour donner un changement de couleur caractéristique, soit du substrat lui-même, soit d'un indicateur ajouté (chromogène).

L'antigène pour recouvrir les plaques est dérivé du sang d'un rat fortement parasitémique. Les trypanosomes sont séparés sur colonne de DEAE cellulose et lavés 3 fois par centrifugation en PSG, pH 8 à froid (PBS avec 1 % de glucose). Le culot final est mis en suspension à froid en PSG à une concentration de 3 à 5 % et brièvement ultrasonné sur glace pendant 30 à 120 s jusqu'à ce que la désintégration des parasites soit complète. Cette préparation est centrifugée à 4 °C et 40 000 *g* pendant 60 min. Le surnageant est dilué dans l'eau pour obtenir une concentration de protéine de 1 mg/ml. Le réactif ainsi obtenu peut être conservé en petites fractions aliquotées à -70 °C pendant plusieurs mois. Il peut aussi être lyophilisé et

conservé à -20°C . Différents traitements des préparations d'antigènes ont été essayés pour améliorer la précision de la détection des anticorps (32).

- **Protocole**

- i) Diluer ou reconstituer l'antigène congelé ou lyophilisé avec un tampon 0,01 M de carbonate/bicarbonate de pH 9,6. Ajouter 100 μl dans chaque puits d'une plaque microtitre à 96 puits et incuber pendant la nuit à 4°C ou pendant 1 h à 37°C .
- ii) Éliminer l'excès d'antigène en lavant les plaques avec 0,01 M de PBS contenant 0,05 % de Tween 20 (PBST). Ajouter les dilutions de sérum en PBST (100 μl). Inclure des témoins positif et négatif. Les dilutions sont déterminées de façon empirique mais sont, en général, comprises entre 1/100 et 1/1 000.
- iii) Incuber les plaques à 37°C pendant 30 min. Jeter le contenu et laver 3 fois avec le PBST.
- iv) Ajouter l'antiglobuline spécifique conjuguée à la peroxydase (100 μl) et diluée de façon appropriée en PBST (d'habitude entre 1/1 000 et 1/50 000).
- v) Incuber de nouveau les plaques à 37°C pendant 30 min, jeter le contenu et lavées 3 fois avec le PBST.
- vi) Pour les conjugués à la peroxydase, un certain nombre de solutions substrat/chromogène peuvent être utilisées, consistant en peroxyde d'hydrogène avec un chromogène, comme la tétraméthylbenzidine (TMB), l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) et l'ortho-diphényldiamine (OPD). Une solution possible de substrat/chromogène pour des conjugués à la peroxydase est le peroxyde d'hydrogène à 30 % (0,167 ml et 35 mg) en tampon citrate (100 ml), pH 6,0. Le tampon citrate est composé comme suit : solution A (36,85 ml) : (0,1 M d'acide citrique [21,01 g/litre]) ; solution B (65,15 ml) : (0,2 M, Na_2HPO_4 [35,59 g/litre]) ; et eau distillée (100 ml). Dissoudre 10 mg de TMB dans 1 ml de diméthylsulfoxyde et ajouter à 99 ml de tampon citrate. Un certain nombre de ces associations sont disponibles commercialement dans des formulations prêtes à l'emploi qui demeurent stables à 4°C pendant 1 an.
- vii) Ajouter le substrat chromogène est ajouté (100 μl) et les plaques sont incubées à la température du laboratoire pendant 15 à 20 min.
- viii) Arrêter la réaction en ajoutant 50 μl d'acide sulfurique 1 M. L'absorption du mélange contenu dans chaque puits est lue à 450 nm pour le chromogène TMB. D'autres chromogènes peuvent exiger l'utilisation d'une longueur d'onde différente. Toutes les épreuves doivent inclure des sérums témoins connus comme fortement et moyennement positifs, un sérum témoin négatif et un tampon témoin.

Il existe une grande variété d'autres protocoles. Pour des espèces animales étroitement apparentées, des réactifs donnant des réactions croisées (ex : immunoglobuline anti-bovin pour les buffles) peuvent souvent être employés, aussi l'utilisation de conjugués anti-IgG mono-spécifiques est recommandé. Il existe un grand nombre de méthodes qui peuvent être utilisées pour déterminer un point limite de discrimination entre les résultats positifs et négatifs. La méthode consiste à baser le point limite sur l'observation visuelle des résultats de l'épreuve obtenus sur des populations connues comme positives et négatives. Ces résultats sont susceptibles de se chevaucher quelque peu. L'opérateur peut choisir le point le plus approprié pour modifier les résultats faussement négatifs et faussement positifs selon l'application requise de l'épreuve. Une alternative est de faire reposer le point limite sur la moyenne des déviations standards (DS) +2 ou sur les valeurs DS +3 d'un grand échantillon d'animaux négatifs. Finalement, si l'on ne dispose pas de suffisamment d'échantillons négatifs/positifs, un point limite peut être déterminé d'après l'analyse des données provenant des animaux vivant dans une situation enzootique. Si une distribution bi-modale sépare les animaux infectés des non-infectés, une valeur appropriée peut alors être sélectionnée. L'ELISA convient pour identifier correctement les animaux négatifs. Des résultats équivoques peuvent être retestés en utilisant le CATT. Des épreuves diagnostiques incorporant des antigènes dérivés d'un seul VAT doivent être interprétées avec précaution et complètement évaluées chez différents hôtes et dans différentes régions géographiques pour déterminer si leur valeur s'accorde à toute la gamme des souches de *T. evansi*. L'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (ITM) a développé une épreuve ELISA utilisant le VSG obtenu à partir du clone RoTat 1.2 de *T. evansi*. Il a été démontré (30) que cet antigène est prédominant chez *T. evansi* et absent chez *T. b. brucei*. Cet ELISA/RoTat 1.2 a été utilisé avec succès sur le terrain au Vietnam (11, 29). Des protocoles détaillés pour l'utilisation chez les chevaux, les camélidés et les buffles d'Asie sont disponibles auprès de l'ITM.

c) Tests d'agglutination sur carte

Il est bien connu que certains types d'antigènes variables prédominants (VATs pour *Variable Antigen types*) sont exprimés en commun par différentes souches de trypanosomes salivaires de différentes zones. Sur la base de cette connaissance, un test pour le diagnostic de *T. evansi*, le test d'agglutination sur

carte - CATT/*T. evansi* - a été développé au Laboratoire de sérologie de l'ITM³. Ce test utilise des trypanosomes fixés et colorés d'un VAT défini connu sous le nom de RoTat 1.2. Aussi bien les antigènes de surface variables et invariants prennent part à la réaction d'agglutination. Le CATT est disponible à l'ITM sous forme de kit de diagnostic. Il comprend en un antigène lyophilisé, du PBS à pH 7,4, des cartes plastifiées, des spatules, des témoins positif et négatif et un rotateur. L'antigène lyophilisé peut être conservé entre 2 et 8 °C jusqu'à 1 an. L'antigène reconstitué peut être conservé entre 2° et 8 °C pendant 2 jours, mais doit être utilisé de préférence dans les 8 h.

Pour faire le test, diluer le sérum à tester au 1/4 ou 1/8 dans les cercles inscrits à la surface des cartes plastifiées. Déposer 45 µl de la suspension d'antigène dans les cercles de la carte-test. Ajouter 25 µl de chaque sérum à tester. Après mélange et étalement des réactifs, la carte est déposée sur le rotateur et soumise à sa rotation pendant 5 min. Comparer le résultat de l'agglutination avec les illustrations données avec le kit de diagnostic. Une réaction positive est révélée par l'apparition de dépôts granuleux de couleur bleue, visibles à l'œil nu.

c) Les tests d'agglutination avec billes de latex

Un kit de diagnostic est disponible auprès de l'ITM d'Anvers. Il comprend une suspension lyophilisée de billes de latex sensibilisées avec les antigènes variables de *T. evansi* RoTat 1.2, du PBS, des témoins négatif et positif, des cartes pour le test, des spatules en plastic et un rotateur.

Reconstituer les particules de latex sensibilisées avec les antigènes avec de l'eau distillée et dé-ionisée. Mélanger doucement. Ajouter 20 µl de la suspension de latex sur chaque tache noire de la carte test.

Diluer les sérums à tester avec du PBS (1/2 et 1/4) et ajouter 20 µl à la suspension de billes de latex. Inclure les témoins appropriés. Mélanger doucement les réactifs avec une spatule de plastique.

Placer sur le rotateur à 70 rotations/min pendant 5 min et regarder les cartes à la fin de l'incubation sous une source de lumière forte. Les sérums positifs entraîneront l'agglutination des particules de latex.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'existe pas de vaccins pour cette maladie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BAJYANA SONGA E. & HAMERS R. (1988). A card agglutination test (CATT) for veterinary use based on an early VAT RoTat 1–2 of *Trypanosoma evansi*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, **68**, 233–240.
2. CLAES F., AGBO E.C., RADWANSKA M., TE PAS M.F.W., BALTZ T., DE WAAL D.T., GODDEERIS B.M., CLASSEN E. & BUSCHER P. (2003). How does *Trypanosoma equiperdum* fit into the *Trypanozoon* group? A cluster analysis by RAPD and multiplex-endonuclease genotyping approach. *Parasitology*, **26**, 425–431.
3. CLAES F., RADWANSKA M., URAKAWA T., MAJIWA P.A., GODDEERIS B. & BUSCHER P. (2004) Variable surface glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. *Kinetoplastid Biol. Dis.*, **3**, 3.
4. DARGANTES A.P., REID S.A. & COPEMAN D.B. (2005). Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. I Clinical signs and pathology. *J. Comp. Pathol.*, **133**, 261–266.
5. DARGANTES A.P., REID S.A. & COPEMAN D.B. (2005). Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. II Pathology. *J. Comp. Pathol.*, **133**, 267–276.
6. DAVISON H.C., THRUSFIELD M.V., MUHARSINI S., HUSEIN A., PARTOUTOMO S., MASAKE R. & LUCKINS A.G. (1999). Evaluation of antigen- and antibody-detection tests for *Trypanosoma evansi* infections of buffaloes in Indonesia. *Epidemiol. Infect.*, **123**, 149–155.

3 Des kits de diagnostic CATT / *T. evansi* sont disponibles auprès de l'Institut de Médecine Tropicale, laboratoire de sérologie, Nationalestraat 155, b-2000 Anvers, Belgique (pbuscher@itg.be, f.claes@itg.be)

7. FRANKE C.R., GREINER M. & MEHLITZ D. (1994). Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Pocone (Mato Grosso, Brazil). *Acta Trop.*, **58**, 159–169.
8. GUTIERREZ C., CORBERA J.A., JUSTE M.C., DORESTE F. & MORALES I. (2005). An outbreak of abortions and high neonatal mortality associated with *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels in the Canary Islands. *Vet. Parasit.*, **130**, 163–168.
9. HOLMSTEDT H. (1965). Simple microcentrifuge for use in the field. *Science*, **149**, 977–978.
10. HOLLAND W.G., CLAES F., MY L.N., THANH N.G., TAM P.T., VERLOO D., BUSCHER P., GODDEERIS B. & VERCRUYSE J. (2001). A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Vet. Parasit.*, **97**, 23–33.
11. HOLLAND W.G., THANH N.G., MY L.N., MAGNUS E., VERLOO D., BUSCHER P., GODDEERIS B. & VERCRUYSE J. (2002). Evaluation of whole fresh blood and dried blood on filter paper discs in serological tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally infected water buffaloes. *Acta Trop.*, **81**, 159–165.
12. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA) (1993). Improving the diagnosis and control of trypanosomiasis and other vector-borne diseases of African livestock using immunoassay methods. International Atomic Energy Agency, TECDOC, 707, 171 pp.
13. KASHIWAZAKI Y., KANITPUN R., SUTEERAPARP P. & BOONCHIT S. (2000). A preliminary comparative study of a dipstick colloidal dye immunoassay and two antigen-detection ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in cattle. *Vet. Res. Commun.*, **92**, 533–544.
14. KELLY S. & SCHILLINGER D. (1983). Improved field diagnostic technique for trypanosomiasis by use of a microcentrifuge. *Vet. Rec.*, **113**, 219.
15. LANHAM S.M. & GODFREY D.G. (1970). Isolation of salivarian Trypanosomes from man and other mammals using DEAE – Cellulose. *Exp. Parasitol.*, **28**, 521–528.
16. LEJON V., CLAES F., VERLOO D., MAINA M., URAKAWA T., MAJIWA P.A. & BUSCHER P. (2005). Recombinant RoTat 1.2 variable surface glycoprotein as antigen for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in dromedary camels. *Int. J. Parasitol.*, **35**, 455–460.
17. LOHR K.F., PHOLPARK S., SIRIWAN P., LEESIRIKUL N., SRIKITJAKARN & STAAK C. (1986). *Trypanosoma evansi* infection in buffaloes in North-East Thailand. II. Abortions. *Trop. Anim. Health Prod.*, **18**, 103–108.
18. MONZON C.M., MANCEBO O.A. & ROUX J.P. (1990). Comparison between 6 parasitological methods for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in the subtropical area of Argentina. *Vet. Parasitol.*, **36**, 141–146.
19. MASIGA D.K. & GIBSON W.C. (1990). Specific probes for *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* based on kinetoplast DNA minicircles. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **40**, 279–284.
20. NJIRU Z.K., CONSTANTINE C.C., NDUNG’U J.M., ROBERTSON I., OKAYE S., THOMPSON R.C. & REID S.M. (2004). Detection of *Trypanosoma evansi* in camels using PCR and CATT/T. *evansi* tests in Kenya. *Vet. Parasitol.*, **124**, 187–199.
21. ONAH D.N., HOPKINS J.A. & LUCKINS A.G. (1998). Increase in CD5⁺ B cells and depression of immune responses in sheep infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **63**, 209–222.
22. RAE P.F., THRUSFIELD M.V., HIGGINS A., AITKEN C.G.G., JONES T.W. & LUCKINS A.G. (1989). Evaluation of enzyme immunoassays in the diagnosis of camel (*Camelus dromedarius*) trypanosomiasis: a preliminary investigation. *Epidemiol. Infect.*, **102**, 297–307.
23. REID S.A. & COPEMAN D.B. (2002). Evaluation of an antibody-ELISA using five crude antigen preparations for the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in cattle. *Vet. Parasitol.*, **104**, 79–84.
24. REID S.A. & COPEMAN D.B. (2003). The development and validation of an antibody-ELISA to detect *Trypanosoma evansi* infection in cattle in Australia and Papua New Guinea. *Prev. Vet. Med.*, **61**, 195–208.
25. REID S.A., HUSEIN A. & COPEMAN D.B. (2001). Evaluation and improvement of parasitological tests for *Trypanosoma evansi* infection. *Vet. Parasitol.*, **102**, 291–297.

26. SACHS R. (1984). Improvements in the miniature anion exchange centrifugation technique for detecting trypanosomes in domestic pigs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **78**, 561.
27. TUNTASUVAN D., CHOMPOOCHAN T., VONGPAKORN M. & MOHKAWE K. (1996). Detection of *Trypanosoma evansi* antibodies in pigs using an enzyme linked immunosorbent assay. *J. Thai Vet. Med. Assoc.*, **47**, 45–53.
28. VENTURA R.M., TAKEDA G.F., SILVA R.A., NUNES V.L., BUCK G.A. & TEIXEIRA M.M. (2002). Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. *Int. J. Parasitol.*, **32**, 53–63.
29. VERLOO D., HOLLAND W., MY L.N., THANH N.G., TAM P.T., GODDEERIS B., VERCRUYSE J. & BUSCHER P. (2000). Comparison of serological tests for *Trypanosoma evansi* natural infections in water buffaloes from north Vietnam. *Vet. Parasitol.*, **92**, 87–96.
30. VERLOO D., MAGNUS E. & BUSCHER P. (2001). General expression of RoTat 1.2 variable antigen type in *Trypanosoma evansi* isolates from different origin. *Vet. Parasitol.*, **97**, 183–189.
31. VISESHAKUL N. & PANYIM S. (1990). Specific DNA probe for the sensitive detection of *Trypanosoma evansi*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, **21**, 21–27.
32. WUYTS N., CHODESAJJAWATEE N. & PANYIM S. (1994). A simplified and highly sensitive detection of *Trypanosoma evansi* by DNA amplification. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, **25**, 266–271.

*

* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour les infections à *Trypanosoma evansi* (y compris le surra) (voir le Tableau dans la Partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site web de l'OIE pour une liste actualisée: www.oie.int).

TULARÉMIE

RÉSUMÉ

La tularémie est une zoonose causée par Francisella tularensis. La bactérie responsable est un bâtonnet coccoïde, 0,2 à 0,5 µm × 0,7 à 1,0 µm, non mobile, non sporulé, aérobie obligatoire avec une température optimale de croissance de 37 °C. Il est oxydase-négatif, légèrement catalase positif et requiert de la cystéine pour sa croissance. Il infecte naturellement les lagomorphes (lapins et lièvres) et les rongeurs, spécialement les petits rongeurs (campagnols et rats musqués) et les castors. Beaucoup d'autres mammifères et plusieurs espèces d'oiseaux peuvent également être infectés. Parmi les animaux domestiques, le chat semble pouvoir être un porteur de la bactérie.

Deux types de F. tularensis sont décrits sur la base des caractéristiques de culture, d'épidémiologie et de virulence dans certain hôte. La tularémie est largement répandue dans l'hémisphère Nord et est normalement absente des tropiques et de l'hémisphère Sud. Francisella tularensis subsp. tularensis (type A) est associé aux lagomorphes en Amérique du Nord. La bactérie est transmise par les tiques et les mouches piqueuses, est hautement pathogène pour l'homme et les lapins domestiques et la plupart des souches fermentent le glycérol. Francisella tularensis subsp. palaeartica (type B) infecte principalement les rongeurs aquatiques (castors et rats musqués) en Amérique du Nord ainsi que les lièvres et les petits rongeurs en Eurasie. Elle est transmise par l'eau ou par des arthropodes, est moins virulente pour les humains et les lapins et elle ne fermente pas le glycérol. En plus de la transmission vectorielle, la tularémie peut être transmise par contact avec des animaux infectés, ou par inhalations de contaminations environnementales, ou par ingestion de viande peu cuite provenant d'animaux infectés ou d'eau contaminée.

La maladie se caractérise par de la fièvre, un état de dépression et une septicémie. Chez l'homme, il peut y avoir des ulcères ou des abcès au site d'inoculation (rarement vu chez les animaux), et une hypertrophie nœuds lymphatiques. L'examen post-mortem peut révéler une nécrose des nœuds lymphatiques ainsi que de multiples foyers nécrotiques gris blanc, dans la rate, le foie, la moelle osseuse et les poumons. Le volume de la rate est généralement augmenté.

Il est important de comprendre qu'il y a un risque élevé d'infection directe de l'homme par contact direct avec cet agent. Des précautions spéciales, incluant le port de gants, de masques et de lunettes de protection sont de ce fait recommandées lorsqu'on a à manipuler du matériel infectieux. Les locaux doivent répondre aux exigences de l'OIE pour le niveau 3 de confinement des agents pathogènes (voir Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries »).

Identification de l'agent pathogène : *la bactérie peut être mise en évidence dans des étalements ou sur coupes fixes d'organes tels la rate, le foie, la moelle osseuse, le rein ou le poumon ainsi que sur des étalements sanguins. Les méthodes immunologiques, comme l'immunofluorescence, sont les plus sûrs moyens d'identifier la bactérie. Par la coloration de Gram, la bactérie apparaît comme un très petit bâtonnet punctiforme Gram négatif, souvent difficile à distinguer en tant que bactérie. Elle peut également être colorée par la coloration au May-Grunwald-Giemsa ou au phénol thionine.*

L'organisme a une croissance lente. Pour croître, il requiert l'utilisation du milieu Francis, McCoy et Chapin ou de gélose Thayer-Martin modifiée. Les colonies sont petites, rondes et transparentes et n'apparaissent qu'après 48 h d'incubation. Sur le milieu Francis, les colonies peuvent être confluentes et prendre une apparence laiteuse. S'il est nécessaire de les transporter, les échantillons doivent être ensemencés dans des milieux stériles et stockés à 4 à 10 °C pendant quelques heures ou à -70 °C si le transit doit être prolongé.

Auparavant, des souris ou des cochons d'Inde étaient utilisés pour le diagnostic expérimental de la tularémie par injection de tissus ou de cultures infectés. L'inoculation à des animaux a été remplacée par la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) pour l'identification de *F. tularensis*. L'immunofluorescence permet de mettre en évidence *F. tularensis* dans les échantillons.

Épreuves sérologiques : les épreuves sérologiques sont utilisées pour le diagnostic chez l'homme. Chez les espèces animales les plus sensibles, leur utilisation est limitée puisque les animaux meurent en général avant d'avoir développé des anticorps. Des études épidémiologiques peuvent être conduites chez les animaux domestiques, dans les espèces relativement résistante qui peuvent survivre après infection, comme les moutons, les bovins, cochons, chiens, chats et ongulés sauvages puisque ces espèces développent des anticorps. Des espèces relativement résistantes de rongeurs et de lagomorphes peuvent également être utilisées dans des études épidémiologiques. Des études sérologiques peuvent et sont conduites chez les espèces sauvages comme les élans qui sont exposés à *F. tularensis*.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : un vaccin atténué vivant est disponible pour la vaccination humaine dans les cas de forts risques d'exposition aux formes virulentes de *F. tularensis*. Cependant, le vaccin n'est disponible que dans des cas particuliers. L'efficacité de la vaccination peut être estimée par la démonstration de la présence d'anticorps spécifiques et par la prolifération lymphocytaire en présence d'antigène de *F. tularensis*.

A. INTRODUCTION

La tularémie est une zoonose due à *Francisella tularensis*. Elle existe naturellement chez les lagomorphes (lapins et lièvres) et les rongeurs, notamment chez les petits rongeurs comme les campagnols, les rats musqués, ainsi que chez les castors. Par ailleurs, une grande variété d'autres mammifères, d'oiseaux, d'amphibiens et d'invertébrés peuvent également être infectés (19, 20). La tularémie existe de manière endémique dans l'hémisphère Nord. La maladie apparaît sous forme d'épisodes épzootiques dans beaucoup de pays en Amérique du Nord et en Europe tandis qu'elle apparaît uniquement sous forme de cas sporadiques dans d'autres pays d'Europe ou d'Asie. Elle est très rarement déclarée dans des pays tropicaux ou de l'hémisphère Sud. Plusieurs épisodes épzootiques ont été signalés comme conséquence de l'importation de lagomorphes infectés de manière sub-clinique.

Les deux types de *F. tularensis* les plus intéressants au plan clinique sont reconnus sur la base de leurs caractéristiques de culture, de l'épidémiologie et de la virulence. *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* (type A) est principalement associée aux lagomorphes en Amérique du Nord. Elle est principalement transmise par les tiques ou les mouches piqueuses ou par contact direct avec des lagomorphes infectés. Elle est très virulente pour l'homme et les lapins domestique, et la plupart des souches isolées fermentent le glycérol. *Francisella tularensis* subsp. *palaeartica* (type B) infecte principalement les rongeurs aquatiques (castors et rats musqués) et les campagnols dans le nord de l'Amérique du Nord, et les lagomorphes (lièvres) et les rongeurs dans le nord de l'Eurasie. Elle est principalement transmise par contact direct ou par des moustiques mais peut aussi être transmise par inhalation ou par l'ingestion d'eau ou de nourriture contaminées. Elle est moins virulente pour l'homme et les lapins domestiques et ne fermente pas le glycérol (1, 7, 14, 15, 17, 22).

Chez les animaux sensibles, les signes cliniques de grave dépression sont suivis par une septicémie fatale. Le déroulement de l'infection requiert approximativement entre 2 et 10 jours chez les espèces sensibles et les animaux sont en général morts au moment du diagnostic. La plupart des espèces domestiques ne manifeste pas de signes de l'infection tularémique, mais elles développent des anticorps spécifiques après l'infection. Des cas avec mortalité élevée causée par le type A peuvent exister chez le mouton (1, 17). Parmi les espèces domestiques, le chat semble être un porteur de la bactérie (6) et la maladie peut à l'occasion passer du chat à l'homme (8).

À l'autopsie, les animaux morts de tularémie aiguë sont en général en bon état. Ils ont des signes de septicémie caractérisée par des foyers de nécrose dans le foie, la moelle osseuse et la rate. En plus, la rate est habituellement hypertrophiée. Les foyers de nécrose varient en taille, et dans certains cas peuvent être à peine visible à l'œil nu. Les poumons sont en général congestionnés et œdémateux. Il peut y avoir des zones de consolidation, de pneumonie fibrineuse ou de pleurésie. De la fibrine peut être présente dans la cavité abdominale. Des foyers de nécrose sont souvent présents dans un ou plusieurs nœuds lymphatiques. Les nœuds lymphatiques qui sont les plus touchés sont ceux des cavités abdominales et pleurales ainsi que ceux

drainant les extrémités. Dans les espèces moins sensibles, le tableau histologique peut ressembler à celui de la tuberculose avec des granulomes chroniques dans le foie, la rate, les poumons et les reins.

Il y a un grand risque d'infection de l'homme par *F. tularensis*, ceci est dû au fait que la dose infectante est extrêmement faible et que les animaux infectés excrètent la bactérie dans les urines et les fèces. La contamination peut se faire par simple contact. Des précautions adéquates, comme le port de gants, de masques et de lunettes de protection pendant la manipulation de spécimens pathologiques ou de cultures doivent être prises afin d'éviter une contamination humaine. Les locaux et équipements doivent répondre aux exigences de l'OIE pour le niveau 3 de confinement des agents pathogènes, voir le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries ». Les pays qui n'ont pas accès à des laboratoires nationaux ou régionaux équipés doivent envoyer leurs échantillons au Laboratoire de référence de l'OIE. Les animaux inoculés expérimentalement et leurs excréments sont particulièrement dangereux pour les humains.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Francisella tularensis peut être mis en évidence dans des calques d'organe ou des coupes histologiques. Il peut également être identifié par culture ou par inoculation animale. Cependant, *F. tularensis* peut être difficile à isoler à partir d'animaux morts ainsi que de carcasses du fait de la présence d'autres bactéries. Comme le tableau post-mortem est variable, le diagnostic est parfois difficile et les méthodes immunologiques ou immunohistochimiques sont préférables même si les réactifs sont parfois difficiles à obtenir. Il est parfois recommandé que les échantillons fixés soient analysés dans des laboratoires équipés de réactifs et de méthodes appropriés, comme le Laboratoire de référence de l'OIE (voir partie 3).

a) Préparations d'étalement

Les calques d'organe sont faits sur des lames de microscope afin d'obtenir des étalements d'organes comme le foie, la rate, la moelle osseuse, les reins, les poumons ou de sang. La bactérie est abondante dans ces étalements mais peut passer inaperçue du fait de sa petite taille (0,2 à 0,7 µm). Sa présence peut être démontrée par marquage direct ou indirect avec des anticorps fluorescent. Il s'agit d'une technique de diagnostic rapide spécifique et non dangereuse (13, 16, 18).

La coloration de Gram révèle un éparpillement de petites bactéries ponctiformes Gram-négative à la limite de la lisibilité. L'utilisation d'huile à immersion augmente la visibilité des bactéries. Les bactéries peuvent être difficilement distinguables des précipités de coloration.

b) Coupes histologiques

Les bactéries peuvent être mises en évidence sur des coupes en utilisant des méthodes immunohistochimiques comme la technique d'immunofluorescence (16). Ce test est normalement réalisé sur des échantillons de foie, rate ou de moelle osseuse, fixés dans du formol tamponné et montés dans la paraffine. Les lames sont traitées avec du sérum de lapin anti-tularémie, lavées et traitées avec un sérum anti-lapin de mouton conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine. Les échantillons sont examinés sous microscope à fluorescence. Un grand nombre de bactéries peuvent être visualisées dans des lésions nécrotiques et dans le sang.

c) Culture

Francisella tularensis poussera sur un milieu ordinaire, bien que certaines souches peuvent parfois, pour l'isolement initial pousser sur de la gélose au sang. La température de croissance optimale est de 37 °C en atmosphère normale ou enrichie à 5 % de CO₂. Du sang circulant du foie, de la rate et de la moelle osseuse d'animaux moribonds doit être utilisé pour la culture. Il est nécessaire d'utiliser des milieux spécifiques comme :

- i) *Le milieu Francis* : Peptone agar contenant 0,1 % cystine (or cystéine) et 1 % glucose, auquel est rajouté avant solidification 8 à 10 % de sang défibriné de lapin, cheval ou d'humain.
- ii) *Le milieux McCoy et Chapin* : 60 g de jaune d'œuf dans 40 ml de solution normale saline. Mixer délicatement et coaguler en chauffant à 75 °C.
- iii) *L'agar Modifié Thayer-Martin* : milieu de base Glucose cystéine agar (GCA) - supplémenté par de l'hémoglobine et de l'Iso VitaleX.

Les milieux peuvent être stockés 8 à 10 jours à 4 °C. Les colonies qui poussent sur le milieu McCoy sont petites, rondes et transparentes. Une meilleure croissance est obtenue sur le milieu Francis et sur l'agar modifié Thayer-Martin avec des colonies confluentes qui ont une apparence laiteuse et une consistance mucoïde. Sur chacun des milieux, les colonies n'apparaissent qu'au bout de 48 h après incubation à 37 °C.

- iv) L'agar GCA avec de la thiamine (BBL) : quand on l'utilise avec du sang ajouté, le milieu est communément référencé comme du GBCA et peut remplacer le milieu non commercialisé et original décrit par Down et al. (5). Suspendre 58 g de matériel sec dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée et mixer vivement. Chauffer en agitant fréquemment et faire bouillir pendant 1 min. Répartir dans des tubes et stériliser par autoclavage à 118-121 °C pendant 15 min.

Pour des volumes plus importants de milieu de culture, autoclaver à la même température pendant 30 min. Refroidir jusqu'à 45-48 °C. Ajouter de manière stérile 25 ml d'hématies humaines concentrées ou 50 ml de sang défibriné de lapin ou de mouton. Mixer vivement et répartir dans des boîtes. Incuber à 37 °C pendant 24 h avant d'utiliser afin de diminuer l'humidité de surface et de tester la stérilité (5).

Le milieu sélectif suivant peut être utilisé en plus de milieux non sélectifs : *Cystine heart agar* (DIFCO) avec 5 % de sang de lapin et de la pénicilline (100 000 unités), du sulfate de polymyxine (100 000 unités) et de la cycloheximide (0,1 ml d'une solution stock à 1 %) par litre.

Les critères différentiels pour l'identification de *F. tularensis* incluent l'absence de croissance sur des milieux ordinaires, la morphologie cellulaire distinctive, les tests avec des anticorps fluorescent et les réactions d'agglutination. La bactérie est non mobile, ne forme pas de spores, présente une coloration bipolaire et d'apparence uniforme après 24 h de culture mais apparaît pleiomorphe dans des cultures plus vieilles.

Francisella tularensis peut être identifiée dans des étalements colorés, par agglutination avec un anti-sérum hyper immun ou par inoculation d'animaux. Dans les zones d'Amérique du Nord où les deux types de *F. tularensis* peuvent exister, le type A peut être distingué du type B par le fait que la plupart des souches du type A ferment le glycérol.

La bactérie peut également être identifiée par hybridation avec des sondes spécifiques de l'ARNr 16S de *F. tularensis*, *F. tularensis* type A, et *F. tularensis* type B (10), ou par amplification en chaîne par polymérisation (PCR) avec des oligonucléotides ciblant les régions spécifiques du gène codant pour l'ARNr 16S. La PCR permet l'identification du genre, de l'espèce et de la sous-espèce (11).

d) Test de précipitation dans des tubes capillaires à partir d'échantillons pathologiques

Les tissus comme la rate, le foie ou la moelle osseuse sont broyés avec du sable stérile dans 3 à 5 fois leur volume dans une solution saline. La suspension est transférée dans un tube dans lequel sont rajoutés 2 volumes d'éther éthylique. Après agitation, le mélange est laissé à décanter pendant 4 à 5 h à température ambiante. Il est ensuite mélangé à nouveau et est laissé au repos pendant une nuit.

La phase aqueuse est récupérée et centrifugée à 2 000 *g* pendant 30 min. Le surnageant, qui contient l'antigène, est récupéré et distribué dans des tubes capillaires auxquels est ajouté du sérum anti-tularémie.

Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 3 h, puis gardés à 4 °C pendant la nuit. Un résultat positif est visualisé par la formation d'un anneau de précipitation.

e) Inoculation à l'animal

L'inoculation animale est extrêmement dangereuse et n'est recommandée que lorsque les cultures sont négatives et que l'identification de l'agent est nécessaire pour des études épidémiologiques. Elle ne doit être réalisée que dans des installations assurant la biosécurité et des cages doivent être utilisées (voir Chapitre 1.1.2.). Les techniques de PCR doivent être utilisées pour l'identification de *F. tularensis*.

Les animaux de laboratoire (de préférence des souris) sont inoculés avec du matériel issu de culture pour confirmer la nature d'un isolat. Des échantillons pathologiques peuvent être inoculés pour la détection directe de *F. tularensis*. Les souris inoculées meurent en général avant même l'apparition des lésions.

Des injections intra-péritonéales suffisent pour les passages de cultures pures. Chez la souris, toutes les voies d'administration comme la voie sous-cutanée, percutanée ou intraveineuse, sont infectieuses et invariablement fatales entre 2 et 10 jours.

f) Techniques moléculaires

Au cours des dernières années, une épreuve de PCR a été développée qui se révèle une excellente méthode pour identifier *F. tularensis* et a été évaluée pour mettre en évidence *F. tularensis* dans des échantillons prélevés sur des blessures chez l'homme atteint de tularémie (12).

Une épreuve de PCR en temps réel s'est révélée très sensible et spécifique. Elle constitue une grande amélioration pour le diagnostic, d'autant plus que toutes les autres méthodes permettant une identification spécifique de *F. tularensis* subsp. *tularensis* prennent beaucoup plus de temps (23).

Une épreuve à micropuce ADN a aussi été mise au point qui permet de distinguer les souches de la sous-espèce modérément virulente *F. tularensis* subsp. *holarctica* des souches pleinement virulentes de la sous-espèce *F. tularensis* subsp. *tularensis* et de les identifier (3).

2. Épreuves sérologiques

La sérologie est souvent utilisée pour le diagnostic de la tularémie chez l'homme, mais sa valeur est limitée pour les espèces animales sensibles, qui habituellement meurent avant l'apparition des anticorps. La sérologie peut être employée soit sur des sérums ou des extraits pulmonaires (18), pour les études de surveillance épidémiologique d'animaux résistants à l'infection, comme le mouton, les bovins, les cochons, les élans, les chiens et les oiseaux (18, 20). Comme il n'y a pas de différence antigénique entre le type A et le type B, *F. tularensis palaeartica* qui est la moins virulente, peut être utilisée dans tous les tests sérologiques.

a) Agglutination en tube

Le test sérologique le plus communément utilisé est le test d'agglutination en tube. L'antigène est une culture de *F. tularensis* sur du milieu *Francis*. La culture est stoppée après 5 à 6 jours. Les cultures plus jeunes contiennent peu d'antigène. Les colonies sont suspendues dans de l'alcool à 96 %, ce qui donne une suspension épaisse qui peut être stockée entre 1 et 7 jours à température ambiante. Le culot est lavé avec une solution saline et suspendu dans un volume égal de la solution saline. De la poudre de crystal violet est ajoutée à une concentration finale de 0,25 %. Les bactéries sont colorées en ajoutant du crystal violet et en les incubant à 37 °C pendant au moins 24 h et au plus 7 jours.

Après que le surnageant ait été éliminé, le dépôt est remis en suspension dans la solution saline avec ou sans thimerosal (merthiolate) à une concentration finale de 1/10 000 ou de formaldéhyde à une concentration finale de 0,5 %. La suspension est calibrée avec des sérums positifs et négatifs et ajustée en ajoutant de la solution saline pour avoir un antigène, qui lorsqu'il est testé sur des lames, donne une agglutination colorée facilement lisible sans bruit de fond.

Le test est réalisé sur des tubes contenant une quantité fixe d'antigène (0,9 ml) et différentes dilutions de sérum commençant à 1/10, 1/20, 1/40, etc. Le résultat est lu après 20 min sous agitation ou après 1 h dans un bain Marie à 37 °C suivi d'une conservation pendant une nuit à température ambiante. Le sédiment agglutiné est visible à l'œil nu ou de préférence à la loupe. Les tubes positifs sont ceux qui ont un surnageant clair. Des réactions croisées avec *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *Legionella* sp. doivent être considérées.

b) Épreuve immuno-enzymatique

Une autre épreuve sérologique, le test immuno-enzymatique (ELISA), permet aussi un diagnostic précoce de la tularémie (4). Cette méthode est maintenant largement utilisée à des fins cliniques. Différents antigènes, dont la bactérie entière ainsi que les composants subcellulaires (9) ont été utilisés comme antigènes contre les immunoglobulines IgA, IgM et IgG. Deux semaines après l'épisode clinique de tularémie, des anticorps spécifiques peuvent être détectés dans le sérum. Les IgM persistent longtemps et ne peuvent être utilisées pour détecter des infections récentes (2). Pour le diagnostic de routine, des bactéries entières tuées par la chaleur (65 °C, 30 min) peuvent être utilisées comme antigène. Les bactéries peuvent être adsorbées sur des plaques de plastiques en utilisant la procédure habituelle (4) puis différentes dilutions de sérum à tester sont ajoutées. Les réactions positives sont visualisées avec un anti-anticorps marqué avec une enzyme. Le test doit également être lu dans un photomètre en utilisant des sérums négatifs et positifs servant de témoins.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Les vaccins ont été produits avec pour but, la protection humaine, mais comme tous les développements de vaccin impliquent des tests chez les animaux, il est clair que certains des vaccins peuvent également être utilisés pour protéger les animaux. Cependant, dans la plupart des pays, aucun vaccin n'a été autorisé pour usage chez les animaux et aucun vaccin contre la tularémie n'est disponible dans le commerce.

Avant 1940, la vaccination contre la tularémie était effectuée en utilisant les bactéries entières tuées ou des extraits bactériens. Aucun de ces vaccins n'induit une protection contre les souches très virulentes de *F. tularensis*. A la place, des vaccins vivants atténués ont été mis au point. L'atténuation est réalisée par passages répétés de cultures bactériennes sur différents milieux avec ou sans anti-sérum. De tels vaccins atténués ont été utilisés en masse pour vacciner les personnes dans l'ex-Union Soviétique depuis 1946, soit avec des cultures pures, soit avec des mélanges de plusieurs souches.

Un vaccin vivant atténué utilisant *F. tularensis biovar palaeartica* est disponible et peut être utilisé pour des cas de vaccination restreints pour des individus à haut risque (21).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BELL J.F. (1980). Tularaemia. In: CRC Handbook Series in Zoonoses. Section A: Bacterial, Rickettsial, and Mycotic Diseases. Vol. 2, Steel J.H., ed. CRS Press, Boca Raton, Florida, USA, 161–193.
2. BEVANGER L., MAELAND J.A. & KVAN A.I. (1994). Comparative analysis of antibodies to *Francisella tularensis* antigens during the acute phase of tularemia and eight years later. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **1**, 238–240.
3. BROEKHUIJSEN M., LARSSON P., JOHANSSON A., BYSTRÖM M., ERIKSSON U., LARSSON E., PRIOR R.G., SJÖSTEDT A., TITBALL R.W. & FORSMAN M. (2003). Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates expensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *J. Clin. Microbiol.*, **41** (7), 2924–2931.
4. CARLSSON H.E., LINDBERG A., LINDBERG G., HEDERSTEDT B., KARLSSON K. & AGELL B.O. (1979). Enzyme-linked immunosorbent assay for immunological diagnosis of human tularemia. *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 615–621.
5. DOWN C.M., CORIELL L.L., CHAPMAN S.S. & KLAUBER A. (1947). The cultivation of *Bacterium tularensis* in embryonated eggs. *J. Bacteriol.*, **53**, 89–100.
6. ELIASSON H., LINDBACK J., NOURTI J.P., ARNEBORN M., GIESECKE J. & TEGNELL A. (2002). The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 956–960.
7. ELLIS J., OYSTON P.C., GREEN M. & TITBALL R.W. (2002). Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15** (4), 631–646.
8. FELDMAN K.A. (2003). Tularemia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **222** (6), 725–730.
9. FULOP M.J., WEBBER T., MANCHEE R.J. & KELLY D.C. (1991). Production and characterization of monoclonal antibodies directed against the lipopolysaccharide of *Francisella tularensis*. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 1407–1412.
10. FORSMAN M., SANDSTROM G. & JAURIN B. (1990). Identification of *Francisella* species and discrimination of Type A and Type B strains of *F. tularensis* by 16S rRNA Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 949–955.
11. FORSMAN M., SANDSTROM G. & SJOSTEDT A. (1995). Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 38–46.
12. JOHANSSON A., BERGLUND L., ERIKSSON U., GÖRANSSON I., WOLLIN R., FORSMAN M., TÄRNVIK A. & SJÖSTEDT A. (2000). Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J. Clin. Microbiol.*, **38** (1), 22–26.
13. KARLSSON K.A., DAHLSTRAND S., HANKO E. & SÖDERLIND O. (1970). Demonstration of *Francisella tularensis* in sylvan animals with the aid of fluorescent antibodies. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. (B)*, **78**, 647–651.

14. MARKOWITZ L.E., HYNES N.A., DE LA CRUZ P., CAMPOS E., BARBAREE J.M., PLIKAYTIS B., MOOSIER D. & KAUFMAN A.F. (1985). Tick-borne tularemia. *JAMA*, **254**, 2922–2925.
15. MOLLARET H.H. & BOURDIN M. (1972). Le diagnostic biologique de la tularémie humaine. *Med. Mal. Infect.*, **2**, 419–422.
16. MORNER T. (1981). The use of FA technique of detecting *Francisella tularensis* in formalin fixed material. *Acta Vet. Scand.*, **22**, 296–306.
17. MORNER T. & ADDISON E. (2001). Tularemia. In: *Infectious Diseases of Wild Mammals*, Third Edition, Williams E.S. & Barker I.K., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 303–313.
18. MORNER T., SANDSTROM G. & MATTSO R. (1988). Comparison of sera and lung extracts for surveys of wild animals for antibodies against *Francisella tularensis* biovar *palaeartica*. *J. Wildl. Dis.*, **24**, 10–14.
19. PEARSON A. (1998) Tularemia. In: *Zoonoses*, Palmer S.R, Soulsby E.J.L. & Simpson D.I.H., eds. Oxford University Press, New York, USA, 303–312.
20. PHAHLER-JUNG K. (1989). Die globale verbreitungen der tularämie. Diss. Justus. Liebig-Universität, Giessen, Germany, 1989.
21. SANDSTROM G. (1994). The tularemia vaccine. *J. Chem. Tech. Biotechn.*, **59**, 315–20.
22. SANDSTRÖM G., SJÖSTEDT A., FORSMAN M., PAVLOVICH N.V. & MISHANKIN B.N. (1992). Characterization and classification of strains of *Francisella tularensis* isolated in the central Asian focus of the Soviet Union and in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, **30** (1), 172–175.
23. TOMASO H., SCHOLZ H.C., NEUBAUER H., DAHOUK A.L., SEIBOLD E., LANDT O., FORSMAN M. & SPLETTSTOESSER W.D. (2007). Real-time PCR using hybridization probes for the rapid specific identification of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Mol. Cell. Probes*, **21** (1), 12–16.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la tularémie (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

STOMATITE VÉSICULEUSE

RÉSUMÉ

La stomatite vésiculeuse (SV) est une affection vésiculeuse des chevaux, des ruminants et des porcs due à des vésiculovirus de la famille des Rhabdoviridae. Lorsque des chevaux ne sont pas atteints par le processus morbide, cette maladie ne peut être cliniquement distinguée de la fièvre aphteuse (FA), de l'exanthème vésiculeux des suidés (EVS) ou de la maladie vésiculeuse des suidés (MVS). Les moutons, les chèvres et de nombreuses autres espèces sauvages peuvent également être atteints par cette maladie. L'homme est aussi sensible. La maladie est confinée au continent américain ; autrefois cependant, elle fut décrite en France et en Afrique du Sud.

Bien que le virus de la stomatite vésiculeuse soit transmis directement par voie cutanéomuqueuse, il a été isolé de stomoxes ou de moustiques, suggérant qu'il puisse s'agir d'une arbovirose. Elle manifeste cependant des variations saisonnières, disparaissant à la fin de la saison pluvieuse dans les régions tropicales et dès l'apparition des premières gelées dans les zones tempérées. Il se pourrait aussi que le virus soit un virus de plantes et que les animaux se trouvent en fin de chaîne épidémiologique. La pathogénie de cette affection n'est pas encore bien établie et des observations montrent que les anticorps humoraux spécifiques ne protègent pas toujours contre une infection par le sérotype des virus de la stomatite vésiculeuse.

Bien que l'on puisse suspecter la présence de la stomatite vésiculeuse lorsque des chevaux sont atteints en même temps que des porcs ou des bovins, il est nécessaire d'effectuer un diagnostic différentiel au laboratoire car les signes cliniques ne sont pas différenciables de ceux de la FA lorsque des bovins et des porcs sont affectés et de ceux de la MVS ou de l'EVS lorsque seuls des porcs sont atteints.

Identification de l'agent pathogène : *le virus de la SV peut être facilement isolé par inoculation à diverses cellules en culture, à des souriceaux nouveau-nés ou à des œufs embryonnés. L'ARN viral peut être détecté à partir du tissu épithélial et du liquide de la vésicule par une transcription inverse associée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) conventionnelle ou en temps réel. L'antigène viral peut être isolé par une méthode immuno-enzymatique sandwich indirecte (IS-ELISA). Cette épreuve est la plus rapide et la moins onéreuse. La fixation du complément est aussi une bonne alternative. On peut aussi utiliser le test de neutralisation virale mais c'est une technique plus élaborée et longue à mettre en œuvre.*

Épreuves sérologiques : *les animaux convalescents développent des anticorps spécifiques dans les 4 à 8 jours suivant l'infection. Ceux-ci peuvent être mis en évidence par un ELISA de blocage en phase liquide (LP-ELISA), un ELISA de compétition (C-ELISA) et une séroneutralisation virale (SN). D'autres tests tels que la fixation du complément, l'immunodiffusion en gélose et l'électrosynérèse ont été décrits.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *des vaccins à virus inactivé adjuvés avec de l'hydroxyde d'aluminium ou un excipient huileux ont été testés respectivement aux États-Unis d'Amérique et en Colombie. Les deux vaccins engendrent des titres élevés d'anticorps spécifiques dans les sérums des bovins vaccinés. Toutefois, on n'a pas la certitude que ces anticorps sériques protègent effectivement contre la maladie. Un vaccin à virus atténué a été mis au point mais son efficacité sur le terrain n'est pas connue.*

A. INTRODUCTION

La stomatite vésiculeuse a été décrite aux États-Unis d'Amérique (USA) en 1926 (18) et 1927 (7) comme une maladie vésiculeuse affectant les chevaux et, un peu plus tard, les bovins et les porcs. Le virus engendre l'apparition de vésicules sur la langue, les lèvres, les muqueuses buccales, les trayons et le bourrelet coronaire du pied des bovins, chevaux, porcs, ainsi que chez d'autres espèces animales domestiques ou sauvages. La maladie naturelle chez les moutons et les chèvres est rare, bien que les deux espèces puissent être infectées expérimentalement. Des infections mixtes, par les virus de la fièvre aphteuse (FA) et de la stomatite vésiculeuse (SV), ont été observées dans les mêmes troupeaux de bovins et peuvent être reproduites expérimentalement. De nombreuses espèces d'animaux de laboratoire sont également sensibles. La maladie est confinée au continent américain ; cependant elle a été décrite en France (en 1915 et 1917) et en Afrique du Sud (1886 et 1897) (11).

Des signes grippaux, habituellement sans présence de vésicules, ont été observés chez l'homme en contact avec des animaux malades ou porteurs du virus infectieux. Toute manipulation de virus de la stomatite vésiculeuse, y compris de matériel infectieux issu d'animaux malades, doit être réalisée en appliquant les procédures de biosécurité adéquates.

Deux catégories immunologiques différentes du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) ont été décrites, New Jersey (NJ) et Indiana (IND). Ces deux virus font partie du genre *Vesiculovirus* et de la famille des *Rhabdoviridae*. Ils ont fait l'objet de nombreuses études moléculaires. Plusieurs autres rhabdovirus apparentés ont été isolés d'autres animaux malades au cours des dernières décennies. On distingue 3 sous-types dans le séro groupe IND sur la base de relations sérologiques : IND-1, IND-2 et IND-3 ; ils sont aussi connus respectivement comme le virus IND classique (VSIV), le virus coccal (COCV) et le virus alagoas (VSAV) (8). Des souches du sérotype NJ et du sous-type IND-1 ont été isolées dans des zones où la maladie sévit à l'état enzootique : Sud du Mexique, Amérique Centrale, Venezuela, Colombie, Équateur et Pérou, le VSV NJ provoquant la majorité (plus de 80 %) des cas cliniques. Des cas sporadiques dus aux virus NJ et VSV IND-1 ont été signalés au nord du Mexique et dans les États de l'ouest des États-Unis. IND-2 n'a été isolé qu'en Argentine et au Brésil et seulement à partir de chevaux (Salto-Argentina/63, Maipú-Argentina/86, Rancharia-Brazil/66, Riberao-Brazil/79) (2, 3). Les bovins cohabitant avec les chevaux atteints ne présentent pas de séroconversion (2). Le sous-type IND-3 (souche Alagoas-Brazil/64), a été isolé sporadiquement au Brésil uniquement. Jusqu'en 1977, les souches du sous-type IND-3 n'ont été isolées que du cheval. Cependant, en 1977, le sérotype IND-3 (souche Espinoza-Brazil/77) fut isolé de bovins au Brésil ; il semble que ce sérotype affecte les chevaux et les bovins, mais ces derniers à un moindre degré (2, 3). Ces faits confirment les premières descriptions de la maladie, en 1926 et 1927 (7, 18), mettant en évidence les sérotypes NJ et IND chez les chevaux et, dans une moindre mesure, chez les bovins et chez les porcs ; cette différence a été observée au cours d'autres foyers de SV.

Le mécanisme de transmission du virus n'est pas encore bien défini. Le fait que le virus ait été isolé de stomoxes, de moustiques et d'autres insectes sous-tend l'hypothèse qu'il pourrait être transmis par les insectes (6, 10, 17). D'autres hypothèses font état du fait que le virus de la stomatite vésiculeuse pourrait être un virus végétal présent sur les pâturages (17) et que les animaux seraient l'extrémité de la chaîne épidémiologique : dans certaines circonstances, le virus pourrait s'adapter de façon à pouvoir infecter des animaux, processus qui serait suivi par un mode de transmission directe entre animaux d'espèces sensibles. Au cours de l'épizootie de 1982 dans l'ouest des USA, un certain nombre de cas ont été observés dont la transmission se faisait directement d'animal à animal (20). Bien que la SV n'ait pas été mise en évidence aux USA chaque année dans le bétail, elle est considérée comme enzootique chez le porc retourné à l'état sauvage sur l'île d'Ossabaw en Géorgie (5).

L'incidence de la maladie peut-être très variable dans les troupeaux infectés. Normalement, 10 à 15 % des animaux présentent des signes cliniques. Les manifestations cliniques sont plus fréquemment visibles chez les adultes. Les bovins et les chevaux de moins de 1 an sont rarement affectés. La mortalité est quasiment nulle dans les deux espèces. Cependant, on peut observer un taux de mortalité élevé chez les porcs atteints par le virus NJ. Les animaux malades recouvrent leur état normal en 2 semaines. Les complications d'importance économique les plus couramment observées sont des mammites et des chutes de production dans les troupeaux laitiers (16). Aux USA en 1995, 1997 et 1998, ce sont les deux sérotypes NJ et IND-1 qui étaient à l'origine des foyers primaires, n'engendrant de signes cliniques que chez les chevaux. Bien que, chez les bovins, quelques signes cliniques aient été observés, la première constatation était seulement une séroconversion.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

La stomatite vésiculeuse ne peut être valablement différenciée cliniquement de la fièvre aphteuse (FA), de l'exanthème vésiculeux (EV) et de la maladie vésiculeuse des suidés (MVS) lorsque les chevaux ne sont pas affectés. Un diagnostic précoce de laboratoire devra être d'urgence mis en œuvre lors de toute suspicion de stomatite vésiculeuse.

La collecte des échantillons et les techniques utilisées pour le diagnostic de la SV doivent être en accord avec la méthodologie utilisée pour le diagnostic de la FA, de l'EV ou de la MVS afin de faciliter le diagnostic de ces affections vésiculeuses. À noter que le virus de la SV est pathogène pour l'homme et que des précautions particulières doivent être prises lorsque l'on manipule des tissus potentiellement infectés par le virus (voir le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries »).

Le liquide vésiculaire, l'épithélium de la paroi des vésicules non rompues, les fragments d'épithélium provenant de vésicules récemment rompues ou les écouvillons réalisés à partir des vésicules rompues sont les prélèvements les plus adéquats. Ces prélèvements peuvent être issus de lésions buccales, de lésions podales ou de tout autre zone où se développent des vésicules. Il est recommandé de tranquilliser les animaux avant d'effectuer les prélèvements afin d'éviter la survenue d'accidents chez les aides en particulier, ainsi qu'en raison du bien-être animal. Les échantillons de toutes les espèces doivent être placés dans des flacons contenant du tampon Tris additionné de bouillon tryptose et de rouge de phénol, à pH 7,6. Si la fixation du complément (FC) doit être mise en œuvre pour la détection de l'antigène, l'ensemble des prélèvements peut être placé en tampon glycérol/phosphate à un pH situé entre 7,2 et 7,6. À noter que le glycérol est toxique pour le virus de la SV et qu'il diminue la sensibilité de l'isolement viral. Son utilisation n'est recommandée que pour la récolte d'échantillons destinés à la fixation du complément. Les prélèvements doivent être conservés sous froid et s'ils peuvent arriver au laboratoire dans les 48 h suivant leur récolte, ils doivent être envoyés réfrigérés. S'ils doivent être envoyés congelés en carboglace, il faut s'assurer que le CO₂ n'entre pas en contact avec l'échantillon et ne détruise pas le virus. Il est nécessaire d'utiliser des emballages spéciaux pour l'envoi des prélèvements en carboglace (pour plus d'informations sur l'envoi des prélèvements destinés au diagnostic (voir le Chapitre 1.1.1., « Prélèvement et expédition des échantillons pour le diagnostic »).

Chez les bovins, lorsque l'on ne peut disposer de tissu épithélial, on peut faire appel à des prélèvements de liquide oesophago-pharyngé prélevés à l'aide d'une curette œsophagienne (pour prélèvement d'expectorations). Chez les porcs, des écouvillons de gorge peuvent être adressés au laboratoire en vue d'un isolement viral. Ce matériel doit être envoyé sous froid en tampon Tris additionné de bouillon tryptose. Si les prélèvements doivent voyager durant plus de 48 h après leur récolte, ils doivent être envoyés congelés sous carboglace comme décrit précédemment. Les prélèvements de liquide oesophago-pharyngé ne doivent pas être traités avec des solvants tels que le chloroforme. Le virus peut être isolé des prélèvements nasaux ou buccaux plus de 7 jours après l'infection initiale.

Lorsqu'il n'est pas possible de réaliser des prélèvements pour l'identification de l'agent, on collectera des sérums d'animaux convalescents ou guéris afin de détecter la présence éventuelle d'anticorps spécifiques et de les quantifier. Il faudra privilégier la récolte de couples de sérums prélevés sur les mêmes animaux à 1 ou 2 semaines d'intervalle, afin d'évaluer les modifications du titre des anticorps.

Des réactifs spécifiques de diagnostic de la SV ne sont pas commercialisés à l'heure actuelle et chaque laboratoire doit préparer les siens ou utiliser ceux fournis par un laboratoire de référence. Les deux laboratoires de référence de l'OIE pour la stomatite vésiculeuse (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*) ainsi que l'Institut de la Santé Animale de Pirbright¹ produisent et distribuent ces réactifs de diagnostic à la demande.

1. Identification de l'agent pathogène

Pour l'identification des sérogroupes de la SV et le diagnostic différentiel avec les affections vésiculeuses des suspensions clarifiées préparées à partir de prélèvements supposés contenir du virus doivent être soumises à différentes épreuves immunologiques. En ce qui concerne l'isolement du virus, les mêmes prélèvements doivent être inoculés à des cultures cellulaires appropriées. L'inoculation de ces prélèvements à différents types de cellules en lignée continue, tels que du rein de singe vert africain (Vero), du rein de hamster nouveau-né (BHK-21) ou du rein de porc (IB-RS-2) permet d'effectuer la différenciation entre les différentes maladies vésiculeuses : les virus des sérogroupes de la SV provoque un effet cytopathogène (ECP) sur les 3 types de lignée ; le virus de la fièvre aphteuse n'engendre d'ECP que sur les cellules BHK-21 et IB-RS-2, tandis que le virus de la MVS ne provoque d'ECP que sur les cellules IB-RS-2. De nombreuses autres cellules, en particulier les cultures de cellules de première explantation d'origine animale, sont sensibles aux virus des sérogroupes de la SV.

Le virus de la SV se multiplie sur la membrane chorio-allantoïdienne d'œufs embryonnés de 8 à 10 jours ; il peut également être isolé de souriceaux de 2 à 7 jours infectés par différentes voies et de souris de 3 semaines inoculées par la voie intra-cérébrale. Dans les 3 cas, le virus de la SV engendre la mort en 2 à 5 jours.

Chez les chevaux et les bovins, l'administration la plus efficace est l'inoculation intradermo-linguale. Les porcs doivent être inoculés par voie sous-cutanée dans le bourrelet coronaire des onglons ou dans le groin. Les lésions

1 Insitute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, Royaume-Uni.

vésiculeuses peuvent être observées sur les muqueuses buccales, la peau des trayons et des pattes dans les 2 à 4 jours suivant l'inoculation. La présence de vésicules secondaires consécutive à l'inoculation chez les bovins et les chevaux dépend essentiellement de la souche virale utilisée. Chez les porcs, le groin est habituellement affecté.

Si l'on observe un ECP dans les cultures, le liquide surnageant peut être utilisé pour l'identification de l'agent par différentes réactions immunologiques et les tapis cellulaires peuvent être colorés par un conjugué-anticorps fluorescent spécifique de la SV, et l'antigène viral peut être détecté par une épreuve immuno-enzymatique (ELISA) ou une épreuve d'amplification en chaîne par polymérase (PCR). Des épreuves similaires peuvent être effectuées avec les suspensions homogénéisées issues du broyat de tissu des muscles squelettiques de souris ou d'embryons de poulet morts de maladie, ainsi qu'avec les suspensions obtenues par broyage de fragments épithéliaux. Le tissu cérébral des souris et souriceaux est une excellente source de virus.

En raison des caractéristiques morphologiques différentes des rhabdovirus (virus des sérogroupes de la SV), picornavirus (virus de la FA et de la MVS), calicivirus (virus de l'EV), et du grand nombre de virions présents dans le liquide vésiculaire et les tissus épithéliaux, il est possible de faire appel à la microscopie électronique pour différencier les familles des différents virus en cause.

Les méthodes immunologiques recommandées pour l'identification des antigènes viraux au laboratoire sont la méthode immuno-enzymatique (ELISA) (2, 9), la fixation du complément (2, 13) et l'immunofluorescence. La séroneutralisation du virus à l'aide de sérums contenant des anticorps dirigés contre le virus de SV ainsi que les sérotypes NJ et IND, peut être réalisée sur les cultures de tissu, les souriceaux nouveau-nés ou les œufs embryonnés mais cela nécessite davantage de temps de manipulation.

a) Isolement du virus

- i) Inoculer les cultures cellulaires en tubes de Leighton et en flacons de 25 cm² avec la suspension clarifiée de broyat de tissu ou de liquide vésiculaire ;
- ii) Incuber les cultures cellulaires inoculées à 37 °C pendant 1 h ;
- iii) Éliminer l'inoculum et laver les cultures cellulaires 3 fois avec du milieu de culture et remplacer le dernier milieu de lavage par du milieu de culture contenant 2,5 % de sérum fœtal de veau ;
- iv) Mettre à incuber les tubes de culture cellulaire entre 33 et 35 °C et observer régulièrement l'apparition de l'ECP ;
- v) Après une incubation de 18 à 24 h, une lamelle de chaque série de tubes de culture cellulaire inoculée avec le même prélèvement est colorée respectivement avec un conjugué SV fluorescent anti-New Jersey et anti-indiana ;
- vi) Les autres tubes de Leighton ainsi que les flacons de culture sont incubés entre 35 et 37 °C pendant plus de 6 jours et observés quotidiennement pour observer l'apparition de l'ECP ;
- vii) Au 7^e jour après l'inoculation, les lamelles des tubes de Leighton restants sont colorées avec le conjugué anticorps fluorescent ;
- viii) Lorsqu'un ECP est observé et que la coloration avec l'antisérum conjugué fluorescent est négative, un second passage doit être réalisé comme décrit précédemment, en utilisant des cellules en flacons de 25 cm². À noter que les premiers passages sur culture cellulaire présentant un ECP peuvent donner de faux résultats négatifs en immunofluorescence. Des dilutions de 10 en 10 peuvent être réalisées et inoculées afin d'obtenir des plages distinctes de cellules fluorescentes ;
- ix) *Interprétation des résultats* : si aucune fluorescence n'est observée et si aucun ECP n'est visible dans le flacon de culture, l'échantillon est négatif pour l'isolement. Si une fluorescence spécifique est observée, l'échantillon est positif pour l'isolement viral ;
- x) Une alternative consiste à inoculer les flacons de culture cellulaire avec les échantillons de terrain, à les incuber entre 35 °C et 37 °C pendant 48 h et à les observer tous les jours pour l'apparition de l'ECP. Si aucun ECP n'est observé après 48 h, les flacons sont congelés et décongelés et les surnageants sont inoculés sur de nouveaux tapis cellulaires. Il est possible de réaliser jusqu'à 3 passages de 48 h chacun. Pour détecter l'antigène viral, les surnageants de chaque passage sont testés en ELISA et en FC.

b) Méthode immuno-enzymatique

L'ELISA sandwich indirect (IS-ELISA) (2, 9) est la méthode de diagnostic de choix pour l'identification des sérotypes viraux de la stomatite vésiculeuse ou d'autres maladies vésiculeuses. L'ELISA utilisant un panel d'antisérums polyvalents de lapin/cobaye préparés contre les virions appartenant aux souches représentatives des 3 sous-types du sérotype IND permet l'identification de toutes les souches du sérotype

IND du virus de la SV (2). Pour la mise en évidence des souches NJ du virus de la SV, il est préférable d'utiliser d'un jeu d'antisérums monovalents de lapin / cobaye (2, 9).

- **Protocole**

- i) *Phase solide* : les plaques d'ELISA sont sensibilisées durant 1 h à 37 °C ou 1 nuit à 4 °C avec des antisérums de lapin et un sérum de lapin normal (comme décrit dans les réf. 2 et 4) dilués de façon adéquate dans du tampon carbonate/bicarbonate à pH 9,6. Elles sont ensuite lavées avec une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) et traitée pendant 1 h à la température du laboratoire dans une solution bloquante de PBS additionné de 1 % d'ovalbumine. Les plaques ainsi préparées peuvent être utilisées immédiatement ou congelées à –20 °C après 3 lavages avec du tampon PBS.
- ii) *Prélèvements à tester* : les suspensions antigéniques des prélèvements à tester (suspension de tissus épithéliaux, de tissu musculaire d'embryon de poulet ou de souriceau en PBS entre 10 et 20 % ou, encore, de surnageant clarifié non dilué de culture cellulaire) sont déposées dans les puits correspondants et les plaques sont incubées pendant 1 h à 37 °C sur un agitateur rotatif.
- iii) *Révélation* : des antisérums monovalents et polyvalents de cobaye dirigés respectivement contre les sérotypes NJ et IND de la stomatite vésiculeuse, qui sont homologues au sérum de lapin qui a servi à la sensibilisation et qui ont été dilués de façon appropriée dans du PBS contenant 0,05 % de Tween 20, 1 % d'ovalbumine, 2 % de sérum de lapin normal et 2 % de sérum normal de veau (PBSTB), sont ajoutés aux puits correspondants et placés pendant 1 h à 37 °C sur un agitateur rotatif.
- iv) *Conjugué* : un conjugué d'immunoglobulines IgG de lapin ou de chèvre anti-immunoglobuline de cobaye et couplé à la peroxydase, dilué dans du PBSTB, est ajouté et mis à réagir pendant 1 h à 37 °C sous agitation.
- v) *Substrat* : un substrat activé à l'H₂O₂ est additionné et les plaques sont placées à la température du laboratoire pendant 15 min. Après addition d'acide sulfurique pour stopper la réaction, les valeurs d'absorbance sont mesurées à l'aide d'un lecteur d'ELISA.

Pour réaliser de ce test, on utilise des volumes de réactif de 50 µl. Les plaques sont lavées à 5 reprises entre chaque étape avec du PBS contenant 0,05 % de Tween 20. Les témoins négatifs de la réaction sont incubés de la même manière.

- vi) *Interprétation des résultats* : un antisérum donnant une absorbance supérieur de 20 % aux autres antisérums, le sérum négatif et les témoins est considéré comme positif vis-à-vis du sous-type viral correspondant.

c) **Test de fixation du complément**

Il est préférable d'utiliser le test ELISA par rapport à la fixation du complément, ce test étant plus sensible et non influencé par d'éventuels facteurs pro- ou anti-complémentaires. Toutefois, lorsque les réactifs permettant de mettre en œuvre l'ELISA ne sont pas disponibles, le test de fixation du complément peut être utilisé. Ce test doit être réalisé dans des plaques de microtitration à fond en U en utilisant les réactifs titrés par le test de fixation du complément à 50 % comme décrit plus bas.

- **Protocole**

- i) *Antisérums* : des sérums de cobaye monovalents anti-virus NJ de la SV et polyvalents anti-virus IND dilués dans du tampon Véronal à une dilution contenant 2,5 UFC₅₀ (50 % d'unités fixant le complément) contre le virus homologue sont déposés dans les cupules. Ces antisérums sont les réactifs utilisés dans l'ELISA.
- ii) *Prélèvements à tester* : la suspension contenant les antigènes à tester, préparée comme décrit pour l'IS-ELISA, est placée dans les puits contenant le sérum.
- iii) *Complément* : 4 UHC₅₀ (Unités hémolytiques de complément à 50 %) sont ajoutées au sérum et à l'antigène. (une alternative consiste à utiliser 7,5, 10 et 20 UHC₅₀ dans le but d'atteindre 4 UHC₅₀ dans la réaction). Le mélange antisérums, échantillon à tester et complément, est mis en incubation à 37 °C pendant 30 min.
- iv) *Couple hémolytique* : une suspension de globules rouges de mouton en tampon véronal sensibilisés avec 10 UH₅₀ (50 % d'unités hémolytiques) de sérum de lapin anti-globules rouges de mouton est placée dans les puits. Le couple hémolytique a une absorbance de 0,66 lue à 545 nm, dans la proportion de 2 volumes de couple hémolytique + 3 volumes d'eau distillée. Le mélange est incubé durant 30 min à 37 °C. Les plaques sont ensuite centrifugées et la réaction est observée à l'œil nu.

La réaction se fera sous un volume de 25 µl pour les antisérums, la suspension à tester et le complément, et de 50 µl pour le couple hémolytique. Des témoins antisérums, antigène, complément et couple hémolytique doivent être inclus dans la réalisation des tests.

Il est possible de réaliser les tests de fixation du complément à 50 % en tubes (2) en utilisant des volumes de réactifs 8 fois plus importants que ceux indiqués pour la réalisation de cette réaction en microplaques. Si l'on utilise ce test, la réaction peut être exprimée par l'absorbance lue à l'aide d'un spectrophotomètre à 545 nm.

- v) *Interprétation des résultats* : si les contrôles sur les témoins sont corrects, les puits dans lesquels se produit une hémolyse < 20 % pour un antisérum donné par rapport aux autres antisérums et aux témoins sont considérés comme positifs pour le type correspondant.

Les prélèvements de terrain qui sont négatifs en ELISA ou en fixation de complément doivent être inoculés à des cultures cellulaires ou des souriceaux nouveau-nés. S'il n'y a aucun signe d'infection virale après 3 passages, le prélèvement est considéré comme exempt de virus de la SV.

d) Méthodes d'identification de l'acide nucléique

La PCR peut être utilisée pour amplifier de petits fragments de l'ARN du virus de la SV (12, 19). Cette technique permet la détection de l'ARN viral dans les tissus, le liquide vésiculaire et le surnageant de culture cellulaire, mais elle ne permet pas de savoir si le virus est infectieux ou non. En général, la PCR n'est pas utilisée pour l'identification en routine du virus de la SV.

2. Épreuves sérologiques

L'ELISA et la séroneutralisation sont les deux tests sérologiques qu'il convient d'utiliser pour l'identification et le titrage des anticorps spécifiques dans le sérum. La réaction de fixation du complément peut être employée pour le titrage des anticorps précoces. L'apparition des anticorps se situe entre le 5^e et le 8^e jour qui suit la contamination. Leur durée n'a pas été déterminée avec précision dans chacun des 3 tests, mais elle devrait être relativement courte pour les anticorps fixant le complément et plus étendue pour les anticorps détectés par la séroneutralisation ou l'ELISA (14).

a) Méthode immuno-enzymatique (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

L'ELISA bloquant en phase liquide (LP-ELISA) est la méthode de choix pour la détection et le titrage des anticorps dirigé contre les virus des sérogroupes de la stomatite vésiculeuse. L'emploi des glycoprotéines virales comme antigène est à recommander car elles ne sont pas infectieuses, elles détectent les anticorps neutralisants et donnent moins de résultats faussement positifs que la séroneutralisation (4).

• Protocole

- i) *Phase solide* : comme décrite dans la section B. 1.a pour l'IS-ELISA.
- ii) *Phase liquide* : des séries de dilutions de 2 en 2 de chaque sérum à tester en commençant au 1/4 sont réalisées en double et réparties dans des plaques de micro-titrage à fond en U. On ajoute à chacun des puits un volume égal de glycoprotéine virale NJ ou IND à la dilution permettant la lyse de 70 % des cellules, et les plaques sont incubées durant 1 h à 37 °C. 50 µl de ce mélange sont ensuite transférés dans chacun des puits de la plaque ELISA en phase solide et placés à 37 °C pendant 30 min sur un agitateur rotatif afin que la réaction puisse se faire.
- iii) *Détecteur, conjugué et substrat* : devront être utilisés les mêmes méthodes et réactifs que ceux préconisés pour l'IS-ELISA.
- iv) *Interprétation des résultats* : les titres sont exprimés en log₁₀ de la dilution finale qui donne 50 % d'inhibition de la D.O. par rapport au sérum négatif de référence, comme indiqué par la méthode de Spearman-Kärber. Les titres supérieurs à 1,3 (1/20) sont considérés comme positifs.

• ELISA de compétition (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Un ELISA de compétition a été mis au point pour la détection des anticorps. La procédure décrite ici est basée sur celle décrite par Afshar et coll. (1). Elle fait appel aux antigènes recombinés des souches de virus NJ et IND-1 de la S.V. comme l'ont décrit Katz et coll. (15).

• Protocole

- i) *Phase solide* : les antigènes sont dilués dans du tampon carbonate/bicarbonate à pH 7,6, et 50 µl sont placés dans chacun des puits de la plaque ELISA à 96 trous. Les plaques sont alors incubées une nuit

à 4 °C ; les plaques sensibilisées peuvent être conservées congelées pendant plus de 60 jours. Ces plaques sont ensuite décongelées, l'antigène est décanté et on leur additionne 100 µl de solution de blocage (solution à 5 % de lait écrémé en poudre dans du PBS [par exemple : 5 g de poudre de lait dissous dans 95 ml de PBS]). Les plaques sont alors incubées à 25 °C pendant 30 min et la solution de blocage est retirée. Les plaques sont lavées 3 fois avec une solution de PBS/Tween 20 à 0,05 %.

- ii) *Phase liquide* : 50 µl de sérum dilué au 1/8 dans 1 % de lait en poudre écrémé en suspension dans du PBS sont additionnés à chacun des 2 puits de chaque échantillon. Un témoin sérum positif et négatif de chaque sérotype doit être placé sur chaque plaque ELISA. Les plaques sont alors incubées à 37 °C pendant 30 min. Elles ne subissent ensuite aucun lavage, mais on rajoute dans chacun des puits 50 µl de liquide d'ascite polyclonal. Elles sont alors remises à incuber à 37 °C pendant 30 min.
- iii) *Révélation* : les plaques sont lavées 3 fois et 50 µl de sérum de chèvre anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort dilué à 1 % dans du lait dégraissé en poudre sont additionnés à chaque puits avec 10 % de sérum normal de chèvre. Les plaques sont alors incubées à 37 °C pendant 30 min, lavées 3 fois et 50 µl d'une solution de tétraméthyl-benzidine (TMB) sont additionnés à chaque puits. Les plaques sont alors incubées à 25 °C pendant 5 à 10 min, et 50 µl d'acide sulfurique 0,05 M sont placés dans chacun des puits. Les plaques sont lues à 450 nm sachant que la densité optique des témoins doit être supérieure à 1,0.
- iv) *Interprétation des résultats* : un échantillon est considéré comme positif si l'absorbance est inférieure ou égale à 50 % de l'absorbance du témoin.

b) Séroneutralisation virale (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Le test de séroneutralisation s'effectue sur des cultures de cellules en microplaques à puits à fond plat en utilisant des sérums à tester inactivés, 1 000 DICT₅₀ (Dose infectieuse pour 50 % des cultures de tissu) des virus NJ ou IND de la stomatite vésiculeuse, et des tapis préformés de cellules Vero M (4) ou une suspension de cellules IB-RS-2. On recherchera la présence de virus non neutralisé.

• Protocole

- i) *Virus* : on utilisera du virus cultivé sur tapis de cellules Vero conservé dans l'azote liquide ou congelé à -70° C.
- ii) *Échantillons à tester* : les sérums seront inactivés à 56 °C pendant 30 min avant d'être testés. Des sérums témoins de référence positifs et négatifs devront être inclus dans le test.
- iii) *Séroneutralisation* : les sérums placés sur les microplaques sont dilués de demi en demi ou de quart en quart à partir d'une dilution initiale au quart. On utilisera deux rangées de puits par sérum. 25 µl de suspension de virus NJ ou IND contenant environ 1 000 DICT₅₀ seront ajoutés à chaque puits et les microplaques seront incubées à 37 °C pendant 60 min pour permettre à la réaction de neutralisation de se faire. 50 µl du mélange sont ensuite déposés sur les tapis cellulaires pré-établis dans les puits des plaques de titrage ou bien 150 µl d'une suspension de cellules Vero ou de cellules IB-RS-2 à raison de 300 000 cellules/ml sont ajoutés à chaque puits contenant le mélange sérum/virus. Les plaques sont ensuite soit recouvertes d'un couvercle lâche et mises à incuber durant 48 à 72 h à 37 °C sous atmosphère de 5 % de CO₂, soit recouvertes de façon étanche par du ruban adhésif et mises à incuber en atmosphère normale. (Il a été établi qu'un titre viral de 1 000 DICT₅₀ réduit les réactions non spécifiques tout en maintenant une grande sensibilité).
- iv) *Interprétation des résultats* : les puits ne présentant pas d'ECP sont considérés comme positifs. Les titres limites des sérums témoins sont calculés par la méthode de Spearman-Kärber lorsque les titres viraux sont compris entre 750 et 1330 DICT₅₀ et lorsque les titres des sérums de référence positif et négatif ont une valeur 2 fois inférieure à celle déterminée au préalable. Les titres de neutralisation 100 % de chaque sérum sont exprimés en log₁₀. Les sérums dont les titres sont égaux ou supérieurs au 1/32 sont considérés comme positifs vis-à-vis de la présence d'anticorps dirigé contre le virus de la stomatite vésiculeuse. Dans un autre protocole, le titre limite du sérum est calculé quand les doses de virus sont de 10^{2±0,5}/100 µl et que les titres des témoins positif et négatif sont compris entre deux dilutions de la valeur moyenne telle qu'elle a été estimée lors de titrages précédents. Le titre neutralisant 50 % de chaque sérum est exprimé en log₁₀. Les sérums avec des valeurs de 1,3 (1/20) ou plus sont considérés positifs pour les anticorps dirigés contre le virus de la stomatite vésiculeuse (4).

c) Fixation du complément (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Une description détaillée de ce test est donnée dans la Section B.1.b. Elle est modifiée comme suit. La réaction de fixation du complément peut être utilisée pour quantifier les anticorps précoces, notamment les IgM. Pour ce faire, des dilutions de sérum de demi en demi sont mélangées à 2 UFC₅₀ d'antigène connu et à 5 % de sérum de veau ou de bovin normal contenant 4 UHC₅₀ de complément. Ce mélange est incubé

pendant 3 h à 37 °C ou une nuit à 4 °C. Le couple hémolytique est ensuite rajouté et une nouvelle incubation de 30 min à 37 °C est réalisée. Le titre du sérum est déterminé par la plus grande dilution dans laquelle aucune hémolyse n'est observée. Les sérums dont les titres sont égaux ou supérieurs à 1/5 sont considérés comme positifs. La fixation du complément est une méthode de faible sensibilité qui est en outre fréquemment mise en défaut par des facteurs anti-complémentaires ou non spécifiques.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Des vaccins à virus atténué ont été éprouvés sur le terrain aux États-Unis d'Amérique, à Panama, au Guatemala, au Pérou et au Venezuela (16, 17). Leur efficacité n'est pas connue. Des vaccins à virus inactivés pour les sérotypes Indiana et New Jersey sont fabriqués en Colombie et au Venezuela (Enquête de l'OIE sur les vaccins, 2002).

Des lignes directrices pour la production de vaccins vétérinaires sont précisées dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices précisées dans le présent chapitre et dans le Chapitre 1.1.8. sont essentiellement de portée générale et peuvent être complétées par des exigences nationales ou régionales.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

L'identité de la semence, y compris l'origine et le nombre de passage du virus, ainsi que l'origine du sérum utilisé pour la multiplication et les passages du virus doivent être connus et consignés.

b) Méthode de culture

La semence virale peut être cultivée sur culture cellulaire. Le choix du type de cellules dépend du degré d'adaptation du virus, la croissance cellulaire dans le milieu et le titre de virus obtenu dans le système cellulaire. Le nombre de passages pour la production du vaccin à partir du lot de semence primaire doit être limité au dernier passage qui s'est révélé efficace.

c) Validation de la culture

La pureté de la semence et des cellules utilisées pour la production du vaccin doit être contrôlée. En utilisant des tests connus pour leur sensibilité, le lot de semence primaire doit être contrôlé indemne de micro-organismes contaminants, bactéries ou mycoplasmes. La fraction aliquotée testée doit posséder un titre approprié pour la production de vaccin, mais pas un titre si élevé que les anti-sérums hyperimmuns ne puissent neutraliser le virus de la semence primaire au cours du test d'identité. Le virus du lot de semence est neutralisé par un anti-sérum mono-spécifique ou un anticorps monoclonal dirigé contre le virus de la semence, et le mélange virus/anticorps est cultivé sur plusieurs systèmes cellulaires. L'utilisation d'une lignée cellulaire très permissive pour le virus de la diarrhée virale bovine, types 1 et 2, est recommandée pour l'évaluation du lot de semence primaire. Le virus de la diarrhée virale bovine est un contaminant possible introduit par l'utilisation de sérum de veau fœtal pour les cultures cellulaires. Les cultures subissent des passages successifs à 7 jours d'intervalle pendant au moins 14 jours, puis on vérifie l'absence de virus contaminants qui auraient pu infecter les cellules ou le lot de semence au cours des passages précédent.

d) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

La semence candidate doit être pure, sans danger, active et efficace.

Le ou les virus utilisés dans la production du vaccin doivent être adaptés au plan antigénique aux virus qui circulent sur le terrain. Une étude vaccination/épreuve sur l'espèce pour laquelle le vaccin est produit permettra d'estimer le degré de protection induite par le vaccin. Les animaux utilisés dans les études vaccination/épreuve ne doivent pas posséder d'anticorps dirigés contre la SV. Les études vaccination/épreuve doivent être réalisées avec le virus prévu dans le protocole de production du vaccin, au nombre de passages maximum autorisé, et en utilisant des animaux des espèces pour lesquelles le vaccin est prévu et comme cela est indiqué sur l'étiquette. Les animaux doivent avoir l'âge requis. Au début, les lots sont préparés avec des quantités variables d'antigène viral. Le lot contenant la quantité la plus faible d'antigène procurant une protection est retenu comme étalon contre lequel les lots suivants seront testés. Pour les vaccins multivalents (contenant par exemple les virus New Jersey et Indiana-1), l'efficacité de chaque valence doit être vérifiée indépendamment puis l'absence d'interférence entre les valences doit être vérifiée sur le mélange.

2. Méthode de fabrication

Une fois que l'efficacité du vaccin a été démontrée et que les autorités de contrôle ont accepté les conditions de production proposées, l'autorisation peut être accordée au vaccin produit. En règle générale, les cultures cellulaires en monocouche ou en suspension à grande échelle sont réalisées dans des conditions strictement contrôlées de température et d'asepsie, et selon des protocoles de production définis, afin de garantir une qualité constante des lots. Une fois que le virus a atteint le titre requis tel qu'on peut le calculer par l'observation de l'ECP, par immunofluorescence ou par toute autre technique approuvée, le virus est clarifié, filtré et inactivé. Une étude de la cinétique d'inactivation doit être menée avec l'agent inactivant autorisé sur un lot ayant un titre supérieur au titre maximum prévu par le protocole de fabrication et qui a été produit selon le même protocole. Cette étude doit démontrer que la méthode d'inactivation est adaptée pour assurer une inactivation complète du virus. Des échantillons prélevés régulièrement au cours de l'inactivation et inoculés à des cultures cellulaires sensibles doivent mettre en évidence une baisse linéaire du titre, baisse qui doit être complète à la fin du processus d'inactivation. Généralement, un adjuvant est ajouté afin d'augmenter la réponse immune.

3. Contrôle en cours de fabrication

Les cultures cellulaires doivent être contrôlées visuellement pour tout aspect anormal ou signes de contamination ; elles sont écartées si l'examen n'est pas satisfaisant. La concentration en virus peut être évaluée en utilisant des épreuves d'infectivité ou de masse antigénique.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

En cours de production, des tests pour la détection d'une contamination par des bactéries, des mycoplasmes ou des champignons doivent être réalisés sur les produits de récolte tant des vaccins à virus atténué qu'à virus inactivés ; ces tests doivent être recommencés sur les produits finaux (voir Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »).

b) Innocuité

L'inactivation complète d'un vaccin à virus inactivé peut être vérifiée par plusieurs passages sur cultures cellulaires à partir de la solution obtenu après inactivation mais avant l'ajout de l'adjuvant, puis confirmée par des tests de mise en évidence du virus.

Le produit final peut être évalué chez l'animal cible en utilisant 2 animaux ayant l'âge minimum requis pour son utilisation, selon les instructions écrites sur l'étiquette ; les animaux sont observés âgés pendant 21 jours. Il est aussi recommandé de réaliser des études d'innocuité sur le terrain dans 3 zones géographiques différentes avec au moins 300 animaux par zone. Si le vaccin est prévu pour les chevaux, les porcs, les bovins ou d'autres ruminants destinés à l'abattoir et à la consommation par les hommes, il convient d'établir le délai entre l'utilisation et l'abattage en fonction de l'adjuvant utilisé (en général, 21 jours) sur la base d'examen histopathologiques dont les résultats sont soumis à l'autorité nationale compétente de contrôle.

c) Activité

La quantité d'antigène est mesurée en cours de production pour vérifier que les titres minimum ont bien été atteints dans le vaccin en vrac. La quantité d'antigène est en général mesurée avant inactivation et toute autre étape du processus. L'activité relative peut être utilisée pour estimer la quantité d'antigène présente dans le produit final. Il est nécessaire de confirmer que les tests utilisés sont sensibles, spécifiques, reproductibles et robustes.

d) Durée de l'immunité

La durée de l'immunité et la fréquence de vaccination recommandée doivent être déterminées avant que le produit reçoive l'autorisation. À l'origine, cette information est obtenue directement par des études vaccination/épreuve sur l'animal cible. La période de protection telle qu'elle est calculée par la capacité des animaux vaccinés à résister à une épreuve peut être incluse dans les renseignements inscrits sur l'étiquette.

e) Stabilité

Les vaccins doivent être conservés à $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, avec une exposition minimum à la lumière. La demi-vie doit être évaluée en utilisant des tests d'activité approuvés (Section C.5.b) et doit être supérieure à la période de validité proposée.

f) Agents de conservation

Il convient autant que possible d'éviter l'emploi de conservateurs. Si cela n'est pas possible, ceux-ci doivent être utilisés à la plus petite concentration possible.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Les vaccins à virus inactivé contre la stomatite vésiculeuse ne présentent probablement aucun danger pour l'utilisateur, bien que des inoculations accidentelles puissent entraîner des réactions néfastes du fait de l'adjuvant et des composants accessoires du vaccin.

5. Contrôles du produit final

a) Innocuité

Des échantillons de flacons contenant le vaccin inactivé final doivent être testés.

b) Activité

Le test établi pour évaluer la plus petite quantité d'antigène entraînant une protection doit être réalisé pour évaluer les nouveaux lots avant livraison. Le test doit être spécifique et reproductible. Il doit être fiable dans la détection de vaccins qui ne sont pas suffisamment efficaces.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AFSHAR A., SHAKARCHI N.H. & DULAC G.C. (1993). Development of a competitive enzyme linked immunosorbent assay for detection of bovine, equine, ovine and porcine antibodies to vesicular stomatitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1860–1865.
2. ALONSO A., MARTINS M., GOMES M.P.D., ALLENDE R. & SONDAHL M.S. (1991). Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection, typing and subtyping of vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **3**, 287–292.
3. ALONSO FERNANDEZ A. & SONDAHL M.S. (1985). Antigenic and immunogenic characterisation of various strains of the Indiana serotype of vesicular stomatitis isolated in Brazil. *Bol. Cen. Panam. Fiebre Aftosa*, **51**, 25–30.
4. ALLENDE R., SEPULVEDA L., MENDES DA SILVA A., MARTINS M., SONDAHL M.S. & ALONSO FERNANDEZ A. (1992). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antibodies. *Prev. Vet. Med.*, **14**, 293–301.
5. BORING W. & SMITH D. (1962). Vesicular Stomatitis Virus: A Survey and Analysis of the Literature. Technical Study No. 43, US Army Biological Laboratories, Fort Detrick, USA.
6. COMER S.A., CORN J.L., STALLKNECHT D.E., LANDGRAF J.G. & NETTLES V.F. (1992). Titers of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype in naturally infected male and female *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) in Georgia. *J. Med. Entomol.*, **29**, 368–370.
7. COTTON W.E. (1927). Vesicular stomatitis. *Vet. Med.*, **22**, 169–175.
8. FEDERER K.E., BURROWS R. & BROOKSBY J.B. (1967). Vesicular stomatitis virus – the relation between some strains of the Indiana serotype. *Res. Vet. Sci.*, **8**, 103–117.
9. FERRIS N.P. & DONALDSON A.I. (1988). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of VSV antigen. *Vet. Microbiol.*, **18**, 243–258.
10. FRANCY D.B., MOORE C.G., SMITH G.C., TAYLOR S.A. & CALISER C.H. (1988). Epizootic vesicular stomatitis in Colorado, 1982: isolation of virus from insects collected along the northern Colorado Rocky Mountain Front Range. *J. Med. Entomol.*, **25**, 343–347.
11. HANSON R.P. (1952). The natural history of vesicular stomatitis. *Bacteriol. Rev.*, **16**, 179–204.
12. HOFNER M.C., CARPENTER W.C., FERRIS N.P., KITCHING R.P. & BOTERO F.A. (1994). A hemi-nested PCR assay for the detection and identification of vesicular stomatitis virus nucleic acid. *J. Virol. Methods*, **50**, 11–20.

13. HOLE K., CLAVIJO A. & PINEDA L.A. (2006). Detection and serotype-specific differentiation of vesicular stomatitis virus using a multiplex, real-time, reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **18**, 139–146.
13. JENNY E.W., MOTT L.O. & TRAUB E. (1958). Serological studies with the virus of vesicular stomatitis. I. Typing of vesicular stomatitis by complement fixation. *Am. J. Vet. Res.*, **19**, 993–998.
14. KATZ J.B., EERNISSE K.A., LANDGRAF J.G. & SCHMITT B.J. (1997). Comparative performance of four serodiagnostic procedures for detecting bovine and equine vesicular stomatitis virus antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 329–331.
15. KATZ J.B., SHAFER A.L. & EERNISSE K.A. (1995). Construction and insect larval expression of recombinant vesicular stomatitis nucleocapsid protein and its use in competitive ELISA. *J. Virol. Methods*, **54**, 145–157.
16. LAUERMAN L.H., KUNS M.L. & HANSON R.S. (1962). Field trial of live virus vaccination procedure for prevention of vesicular stomatitis in dairy cattle. I: Preliminary immune response. Proceedings of the 66th Annual Meeting of the United States Animal Health Association, 365–369.
17. MASON J. (1978). The epidemiology of vesicular stomatitis. *Bol. Cen. Panam. Fiebre Aftosa*, **29–30**, 35–53.
18. OLTSKY P.K., TRAUM J. & SCHOENING H.W. (1926). Comparative studies on vesicular stomatitis and foot and mouth disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **70**, 147–167.
19. RODRIQUEZ L.L., LETCHWORTH G.J., SPIROPOULOU C.F. & NICHOL S.T. (1993). Rapid detection of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype in clinical samples by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 2016–2020.
20. SELLERS R.F. & MAAROUF A.R. (1990). Trajectory analysis of winds in vesicular stomatitis in North America. *Epidemiol. Infect.*, **104**, 313–328.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la Stomatite vésiculeuse (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

FIÈVRE DE WEST NILE

RÉSUMÉ

*Le virus de la fièvre de West Nile (WNV pour West Nile virus) est un membre du genre *Flavivirus* appartenant à la famille *Flaviviridae*. Cet arbovirus se maintient dans la nature en circulant de manière cyclique chez les oiseaux et les moustiques ; de nombreuses espèces d'oiseaux et de moustiques assurent la réplication de ce virus. Pour de nombreuses espèces aviaires, l'infection par le WNV ne cause aucun signe manifeste tandis que d'autres oiseaux, tels que les corneilles américaines (*Corvus brachyrhynchos*) et les geais bleus (*Cyanocitta cristata*), succombent souvent à une maladie systémique mortelle. Parmi les mammifères, la maladie se déclare principalement chez les chevaux et les humains.*

Chez les chevaux, les signes cliniques induits par l'infection par le WNV correspondent à une encéphalite ou à une encéphalomyélite virale. Les infections sont transmises par les moustiques et sont saisonnières dans les climats tempérés, avec un pic au début de l'automne dans l'hémisphère Nord. Les chevaux affectés montrent fréquemment une ataxie légère à sévère. Les signes cliniques peuvent aller d'une incoordination légère au décubitus. Quelques chevaux présentent également un affaiblissement, des tremblements musculaires, et des déficits des nerfs crâniens. La fièvre n'est pas un facteur de la maladie uniformément présent chez les chevaux.

Identification de l'agent pathogène : *les tissus aviaires contiennent généralement des concentrations plus élevées de virus que les tissus équins. Le cerveau et la moelle épinière sont les tissus de prédilection pour l'isolement du virus chez les chevaux. Chez les oiseaux, le rein, le cœur, le cerveau, le foie ou l'intestin peuvent contenir le virus. Les cultures de cellules de rein de lapin ou les cellules Vero sont le plus généralement employées pour l'isolement du virus. Le WNV induit un effet cytopathogène (ECP) dans les cultures cellulaires sensibles à l'infection. L'acide nucléique viral et les antigènes viraux peuvent être détectés dans les tissus des animaux infectés par la technique de la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) et par immunohistochimie. La méthode la plus sensible pour identifier le WNV dans les tissus équins est une RT-PCR nichée.*

Épreuves sérologiques : *les anticorps contenus dans le sérum équin peuvent être identifiés par une méthode immuno-enzymatique (ELISA) de capture d'IgM ou d'IgG, une inhibition de l'hémagglutination (IH), ou par une séroneutralisation par réduction de plaques (PRN pour plaque reduction neutralisation). Les méthodes ELISA et PRN sont les plus généralement employées pour identifier les anticorps anti-WNV dans le sérum aviaire. Des réactions sérologiques croisées avec des flavivirus apparentés, tels que le virus de l'encéphalite de St-Louis, le virus de l'encéphalite japonaise ou l'encéphalite à tiques (TBE pour tick-borne encephalitis), peuvent survenir.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *un vaccin inactivé au formol et dérivé d'une culture de tissus, un vaccin vivant utilisant le canarypoxvirus comme vecteur, un vaccin ADN et un vaccin chimère ont reçu une autorisation pour utilisation chez les chevaux.*

A. INTRODUCTION

Le virus de la fièvre de West Nile (WNV pour *West Nile Virus*) est un arbovirus transmis par les moustiques qui appartient au genre *Flavivirus* de la famille *Flaviviridae* (26). Le genre *Flavivirus* contient également d'autres virus tels que, notamment, ceux de l'encéphalite japonaise (voir le Chapitre 2.1.7.), de l'encéphalite de St-Louis, Le virus de la vallée de Murray, le virus Usutu et le virus de Kunjin (6). Le WNV a une large répartition géographique

incluant des régions d'Europe, d'Afrique, d'Asie, d'Australie (virus Kunjin), d'Amérique du Nord, centrale et du Sud. La dispersion ainsi que la réintroduction du virus à partir de secteurs enzootiques vers des régions qui subissent des épidémies sporadiques s'effectueraient par les oiseaux migrateurs (6). Le WNV se maintient grâce à un cycle de transmission moustique-oiseau-moustique, tandis que les humains et les chevaux sont des impasses épidémiologiques. L'analyse génétique des isolats divise les souches en deux clades. Les isolats de la lignée 1 sont isolés en Afrique centrale et du Nord, en Amérique du Nord et Centrale, en Colombie et en Argentine en Amérique du Sud (18), en Australie (virus de Kunjin), en Europe, en Inde et en Israël. Les souches de la lignée 2 sont enzootiques à Madagascar et en Afrique australe et centrale avec une cocirculation des deux lignées du virus en Afrique centrale (3, 7). Récemment, un rapport a fait état de la présence de la lignée 2 en Hongrie. Les souches de chaque lignée sont responsables des maladies humaines et animales tandis que les épidémies humaines et équine récentes sont provoquées par des virus appartenant à la lignée 1.

Le virus de la fièvre de West Nile a été identifié comme étant un organisme pathogène humain en Afrique durant la première moitié du 20^e siècle. Bien que plusieurs épidémies de fièvre de West Nile aient été décrites, l'encéphalite comme conséquence de l'infection humaine n'a que rarement été décrite avant 1996, mais depuis lors, des épidémies d'encéphalite humaine causées par le WNV ont été rapportées en Roumanie, Russie, Israël, Amérique du Nord, France et Tunisie (4, 11, 13, 15, 33). Pendant les années 1960, la fièvre de West Nile chez les chevaux a été signalée en Égypte et en France (23, 25). Depuis 1998, des manifestations de fièvre de West Nile ont été rapportées en Italie, en France, au Canada, aux États-Unis d'Amérique, en Israël et au Maroc (8, 14, 19, 21). En occident, la répartition géographique du virus s'est nettement agrandie partant d'une petite région le long de la côte Est de l'État de New York pour inclure les états contigus des États-Unis d'Amérique, le Canada, le Mexique, les îles des Caraïbes, l'Amérique centrale, l'Argentine, la Colombie et le Venezuela (10, 18, 21, 30). En dehors des États-Unis et du Canada, l'introduction du WNV dans les régions occidentales n'a pas été caractérisée par de grands foyers de la maladie dans une espèce en particulier, ni par une mortalité significative ; cela pourrait être dû à l'exposition auparavant à des flavivirus indigènes présents dans ces régions.

La période d'incubation de la fièvre de West Nile est estimée de 3 à 15 jours après la transmission par les moustiques. Une virémie passagère accompagnée d'un faible titre de virus précède le début de la phase clinique (5, 25). L'encéphalite due au WNV se produit seulement chez 1 % des chevaux infectés ; la majorité des chevaux infectés ne présente pas de signes cliniques (21). La maladie chez les chevaux est fréquemment caractérisée par une ataxie allant de légère à sévère. De plus, les chevaux peuvent présenter des signes de faiblesse, de tremblements musculaires et des déficits des nerfs crâniens (8, 21, 22, 27). La fièvre n'est pas présente de manière systématique. Le traitement est symptomatique et les signes cliniques peuvent progresser jusqu'à un décubitus final. Le taux de mortalité est approximativement de 1 sur 3 chevaux cliniquement affectés. Le diagnostic différentiel chez les chevaux inclut d'autres encéphalites arbovirales (par exemple, les encéphalomyélites équine vénézuélienne, de l'Est ou de l'Ouest et l'encéphalite japonaise), la myélite équine protozoaire (*Sarcocystis neurona*), l'herpesvirus équin 1, la maladie de Borna et la rage.

La plupart des espèces aviaires peuvent être infectées par le WNV ; les conséquences de la maladie clinique sont variables. Les poulets et les dindes sont résistants. Des cas de maladie avec signes nerveux ont été rapportés chez des oiseaux dans des zoos aux États-Unis et chez des oies domestiques en Israël et au Canada (1, 28, 33). Le WNV a été associé à une maladie sporadique dans un nombre restreint d'autres espèces, notamment chez les écureuils, les tamias, les chauves-souris, les chiens, les chats, le cerf de Virginie, les rennes, les moutons, les alpacas, les alligators et chez un phoque commun pendant des périodes d'intense activité virale localement. La plupart des infections humaines se produisent lors d'une transmission normale par les moustiques, mais des infections acquises en laboratoire ont été rapportées. Dans des cas cliniquement suspects, les échantillons destinés au diagnostic de tous les animaux, en particulier les oiseaux, devraient être manipulés dans un laboratoire de confinement de niveau 3 (voir le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries ») (24). Chez l'homme, la transmission du WNV par transfusion sanguine, greffe d'organes ou la tétée a été confirmée.

En raison de l'existence d'infections inapparentes par le WNV, les critères de diagnostic impliquent une association de l'évaluation clinique et de l'analyse de laboratoire.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

a) Culture

Les prélèvements pour l'isolement du virus comprennent le cerveau et la moelle épinière des chevaux atteints d'encéphalites (21, 22) ; divers prélèvements de tissus d'oiseau comprenant le cerveau, le cœur ou le foie peuvent également être utilisés avec succès (28). Le WNV a été isolé depuis le rein mais le tissu peut être toxique pour les cultures cellulaires. En général, l'isolement du virus est obtenu plus facilement à

partir d'échantillons aviaires. Le virus peut être propagé sur des cultures de cellules sensibles, telles que les cellules de rein de lapin (RK-13) et les cellules de rein du singe vert africain (Vero), ou encore des œufs embryonnés de poulet. Les inoculations intracérébrales de souriceaux nouveau-nés sont moins efficaces pour isoler le virus à partir de tissus de mammifères que les méthodes de culture de cellules. En culture de cellules, plus d'un passage doit être effectué pour observer un effet cytopathogène (ECP). La confirmation de l'isolement du WNV est réalisée par un marquage indirect par des anticorps fluorescents sur les cultures de cellules infectées ou par des méthodes de détection de l'acide nucléique (voir ci-dessous).

b) Méthodes immunologiques

Le marquage immunohistochimique (IHC) de tissus aviaires après fixation au formol est une méthode fiable pour l'identification de l'infection du WNV chez les oiseaux. Le cerveau, le cœur, les reins, la rate, le foie, l'intestin et les poumons sont souvent positifs en IHC chez les oiseaux infectés. Le taux de réussite chez les animaux positifs est augmenté par l'examen de plusieurs organes. La spécificité de l'identification (par exemple, spécifique des flavivirus ou spécifique du WNV) dépend du choix de l'anticorps détecteur. Les tissus du cerveau et de la moelle épinière des chevaux atteints d'une encéphalite due au WNV ne sont pas positifs dans les tests IHC ; environ 50 % des cas de fièvre de West Nile équine donnent des résultats faux-négatifs. L'absence d'identification d'un antigène du WNV dans le système nerveux central équin ne permet pas d'exclure la présence de l'infection.

c) Méthodes d'identification de l'acide nucléique

La détection de l'acide nucléique par la technique de la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) augmente de manière significative l'identification des tissus infectés par le WNV, plus particulièrement quand une PCR nichée est réalisée sur des échantillons équins, frais et non fixés, de cerveau et de moelle épinière (16). La méthode de RT-PCR nichée pour détecter l'acide nucléique du WNV codant une partie du gène E est décrite ci-dessous. Cette méthode, développée en utilisant un isolat nord-américain de 1999, a permis de détecter l'ARN du WNV à partir de tissus animaux lors de récentes épizooties nord-américaines. Le virus de l'encéphalite de St Louis n'est pas détecté par cette méthode. Les virus de la fièvre de West Nile, appartenant à la lignée 1, de Chine, de France, d'Égypte, d'Israël, d'Italie, du Kenya, du Mexique et de Russie montrent une séquence nucléotidique fortement conservée dans la région ciblée, indépendamment de l'espèce d'origine (17). L'analyse de la séquence pour la souche Ouganda 1937 (GenBank M12294), appartenant à la lignée 2, dans la région visée par les amorces de PCR indique qu'il n'y aurait pas d'amplification pour les souches du WNV de la lignée 2. D'autres virus du séro groupe de l'encéphalite japonaise n'ont pas été examinés. Les méthodes non nichées, y compris la PCR en temps réel, présentent moins de risques de contamination transversale en laboratoire et peuvent être appliquées avec succès aux échantillons de tissus aviaires (17). Une PCR en temps réel pour détecter l'acide nucléique du WNV a été décrite (29). Afin de normaliser les différentes techniques moléculaires de diagnostic du WNV, une étude inter-laboratoire de compétence basée sur l'examen de tissu fixé dans le formol a été mise en œuvre et elle a fait l'objet d'un rapport (20). Les tissus choisis pour la PCR sont identiques à ceux choisis pour l'isolement viral.

- **Technique de la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne niche par polymérase (RT-nPCR)**

La RT-nPCR décrite ici comprend plusieurs procédures : l'extraction de l'ARN, la transcription inverse pour produire de l'ADN à partir de l'ARN et la première étape de la PCR, la deuxième étape de la PCR en utilisant les amorces « nichées », et la détection de l'amplicon de taille appropriée par migration dans un gel d'électrophorèse. Les régions de 445 et 248 pb (paire de bases) du gène codant la protéine E du WNV sont respectivement amplifiées dans la première étape de la PCR et PCR nichée. Les kits de diagnostic et les réactifs décrits ci-dessous sont fournis comme exemple. Des produits équivalents peuvent être disponibles par d'autres sources. Une précaution extrême en manipulant tous les matériaux et l'utilisation de témoins appropriés sont essentiels pour assurer des résultats précis. Les précautions à prendre ont été couvertes dans le Chapitre 1.1.5., « Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses ». Des échantillons en double de chaque prélèvement devraient être traités et examinés pour augmenter la confiance des résultats de l'analyse. Il faut respecter les précautions appropriées lors de manipulation de réactifs dangereux tels que le bromure d'éthidium.

- **Extraction de l'ARN viral**

De 50 à 100 mg de tissus sont utilisés pour extraire l'ARN total avec le réactif Trizol® (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) selon les instructions du fabricant. Parallèlement de l'ARN total est extrait d'un stock témoin du WNV contenant 10-100 DICT₅₀ (dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) pour un volume de 100 µl.

- **Transcription inverse et première étape PCR**

Amorces de la première étape :

1401: 5'-ACC-AAC-TAC-TGT-GGA-GTC-3'

1845: 5'-TTC-CAT-CTT-CAC-TCT-ACA-CT-3'

- Dissoudre les échantillons d'ARN extraits dans 12 µl d'eau purifiée de toute RNase.
- Incuber à 70 °C pendant 10 min.
- Ajouter 2 µl de chaque échantillon d'ARN dénaturé à 48 µl de mélange RT-PCR dont la composition finale est de :
 - 10 mM de Tris/HCl, pH 8,3
 - 50 mM de KCl
 - 2,0 mM de MgCl₂
 - 0,8 mM de mélange de déoxynucléoside triphosphate (dNTP)
 - 25 unités de M-MLV (*Moloney murine leukaemia virus*) RT
 - 1,25 unités d'inhibiteur de RNase
 - 1,25 unités d'AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
 - 37,5 pmol d'amorces de la première étape.

Inclure des témoins négatifs en utilisant 2 µl d'eau purifiée de toute RNase à la place de l'ARN dénaturé.
- Incuber les tubes de réaction à 45 °C pendant 45 min.
- Incuber les tubes de réaction à 95 °C pendant 11 min.
- PCR de 35 cycles :
 - Dénaturation à 95 °C pendant 30 s
 - Hybridation des amorces à 55 °C pendant 45 s
 - Elongation des amorces à 72 °C pendant 60 s, (pour le 35^e cycle, élongation des amorces à 72 °C pendant 5 min).
- Laisser les échantillons à 4 °C jusqu'à la deuxième étape de la PCR.

- **Seconde étape PCR (nichée)**

Amorces de la deuxième étape:

1485 : 5'-GCC-TTC-ATA-CAC-ACT-AAA-G-3'

1732 : 5'-CCA-ATG-CTA-TCA-CAG-ACT-3'

- Pour chaque échantillon et témoin, ajouter 1,5 µl du produit de la première étape d'amplification dans :
 - 48,5 µl du mélange de PCR avec une composition finale de :
 - 10 mM de Tris/HCl, pH 8,3
 - 50 mM de KCl
 - 2,0 mM de MgCl₂
 - 0,8 mM d'un mélange de déoxynucléoside triphosphate (dNTP)
 - 1,25 unités d'AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
 - 37,5 pmol de chaque amorce niche.
- Incuber les tubes de réaction à 95 °C pendant 11 min.
- PCR de 35 cycles :
 - Dénaturation à 95 °C pendant 30 s
 - Hybridation des amorces à 55 °C pendant 45 s
 - Elongation des amorces à 72 °C pendant 60 s (pour le 35^e cycle, élongation de l'amorce à 72 °C pendant 5 min).
- Laisser les échantillons à 4 °C ou -20 °C jusqu'à l'électrophorèse.

- **Analyse des produits de PCR par migration en gel d'électrophorèse**

- Préparer une solution d'agarose 2,5 % NuSieve® 3/1 (FMC Bioproducts, Rockland, Maine, USA) dans du Tris/borate 0,045 mM, pH 8,6, EDTA 1,5 mM (acide tétra-acétique de diamine d'éthylène) (× 1 tampon TBE). Faire bouillir l'agarose sur une plaque chauffante ou dans un four à micro-ondes jusqu'à ce qu'elle soit complètement dissoute. Refroidir l'agarose à 45-55 °C. Ajouter 5 µl de bromure d'éthidium (10 mg/ml) pour 100 ml d'agarose chaude et couler le gel d'agarose avec un peigne. Laisser solidifier et ensuite retirer le peigne.

- ii) Ajouter 30 µl de la solution de bromure d'éthidium (10 mg/ml) pour 600 ml du tampon TBE × 1. Placer le gel dans l'appareil d'électrophorèse et remplir le réservoir de tampon.
- iii) Mélanger 15 µl de chaque échantillon et témoin avec 5 µl de solution de chargement du gel (par exemple, produit G-2526, Sigma, St Louis, MO, USA). Ajouter le marqueur de poids moléculaire de 100 pb (par exemple, Life technologies, Grand Island, NY, produit 15268-019, USA, s'étendant de 100 à 1 500 pb) dans au moins un puits du gel. Charger les échantillons dans les puits d'agar et lancer l'électrophorèse à 65-75 volts jusqu'à ce que le colorant de chargement de gel ait parcouru approximativement 2/3 de la longueur du gel.
- iv) Visualiser et photographier le gel sous une lumière ultraviolette.

- **Interprétation du résultat**

Pour que l'analyse par PCR soit valide, les témoins positifs doivent montrer une bande de taille appropriée (248 pb). Les témoins « no ARN » ne devraient pas présenter de bande. Les échantillons sont considérés comme positifs s'il y a une bande de la même taille que le témoin positif. Les échantillons doubles doivent présenter la même réaction. S'il y a une disparité, l'analyse devrait être répétée, en commençant par l'extraction à partir du tissu. Si davantage de validation est exigée, le produit final de la PCR nichée peut être séquencé et comparé aux séquences du WNV publiées et disponibles dans GenBank.

2. Épreuves sérologiques

Les anticorps peuvent être identifiés dans le sérum équin par technique immuno-enzymatique (ELISA) de capture IgM, par inhibition de l'hémagglutination (IH), par ELISA IgG ou par séroneutralisation par réduction des plages (PRN) (2, 12). L'ELISA de capture IgM décrit ci-dessous est particulièrement utile pour détecter les anticorps résultant d'une exposition naturelle et récente au WNV. Les IgM équine spécifiques du WNV sont habituellement détectables à partir de 7 à 10 jours jusqu'à 1 à 2 mois après l'infection. La plupart des chevaux sont positifs en ELISA de capture IgM pour la fièvre de West Nile lorsque les premiers signes cliniques sont observés. Les anticorps neutralisant le WNV sont détectables dans les sérums équins, 2 semaines après l'infection et peuvent persister pendant plus d'une année. Les méthodes d'IH et de PRN sont le plus généralement employées pour identifier les anticorps anti-WNV dans les sérums aviaires. Dans certaines analyses sérologiques, des réactions croisées avec des flavivirus apparentés, tels que le virus de l'encéphalite de St Louis ou le virus de l'encéphalite japonaise, surviendront. L'analyse par PRN est la plus spécifique parmi les analyses sérologiques du WNV ; quand nécessaire, les titres en anticorps dirigés contre des flavivirus apparentés peuvent être examinés en parallèle dans le sérum. En conclusion, l'historique de la vaccination contre le WNV doit être considérée dans l'interprétation des résultats de la sérologie, en particulier dans l'analyse PRN et l'ELISA IgG. L'ELISA de capture IgM peut être employé pour examiner les espèces aviaires ou autres à condition que l'anticorps de capture spécifique de l'espèce soit disponible (par exemple, anti-poulet IgM). L'analyse par PRN est applicable sur n'importe quelle espèce, y compris les oiseaux.

a) ELISA de capture IgM équine

Le WNV et des antigènes témoins négatifs pour l'ELISA de capture IgM peuvent être préparés à partir du cerveau de souris (voir le Chapitre 2.5.5.), de culture de tissus ou de lignées de cellules recombinées (9). Les sources commerciales des réactifs d'analyse du WNV sont disponibles en Amérique du Nord. Le sérum témoin équin, bien qu'il ne soit pas un étalon international, peut être obtenu à partir des laboratoires nationaux des services vétérinaires, Ames, Iowa, États-Unis. Le virus et les antigènes témoins négatifs devraient être préparés en parallèle pour une analyse par ELISA. Les préparations d'antigène doivent être titrées avec des sérums témoins pour optimiser la sensibilité et la spécificité de l'analyse. Les échantillons de sérum équin sont examinés à une dilution de 1/400 et les échantillons équins de liquides céphalo-rachidiens sont examinés à une dilution de 1/2. Pour assurer la spécificité, chaque échantillon de sérum est examiné pour sa réactivité avec l'antigène viral et l'antigène témoin.

- **Protocole**

- i) Ajouter sur des plaques ELISA de 96 puits à fond plat (par exemple, Immulon 2HB, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) 100 µl/puits d'IgM anti-équin diluées dans une solution tampon de carbonate 0,5 M, pH 9,6, selon la dilution suggérée par le fabricant pour l'utilisation comme anticorps de capture.
- ii) Incuber les plaques durant une nuit à 4 °C en chambre humide. Les plaques sensibilisées peuvent être conservées pendant plusieurs semaines.
- iii) Avant l'utilisation, les plaques doivent être lavées 2 fois avec 200 à 300 µl/puits de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) 0,01 M, pH 7,2, contenant 0,05 % de Tween 20 (PBST).

- iv) Bloquer les plaques en ajoutant 300 µl/puits de lait écrémé en poudre à 5 %, fraîchement préparé dans du PBST et incubé 60 min à température ambiante. Après incubation, enlever la solution de blocage et laver les plaques 3 fois avec du PBST.
- v) Les sérums témoins et à tester sont dilués au 1/400 (le liquide céphalorachidien est dilué au 1/2) dans du PBST et 50 µl/puits de chaque échantillon sont ajoutés aux puits dupliqués (total de 4 puits par échantillon) de la plaque. Inclure les témoins positif et négatif préparés de la même manière que les échantillons.
- vi) Recouvrir les plaques et incubé 75 min à 37 °C dans une chambre humide.
- vii) Enlever le sérum et laver les plaques 3 fois dans du PBST.
- viii) Diluer le virus et les antigènes normaux dans du PBST et ajouter 50 µl de l'antigène du virus à l'ensemble des puits par sérums témoins et à analyser, et ajouter 50 µl de l'antigène normal au 2^e groupe de puits par sérums témoins et à analyser.
- ix) Recouvrir les plaques et incubé durant la nuit à 4 °C en chambre humide.
- x) Éliminer les antigènes des puits et laver les plaques 3 fois dans du PBST.
- xi) Diluer l'anticorps monoclonal anti-flavivirus conjugué à de la peroxydase de raifort¹ dans du PBST selon les instructions du fabricant et en ajouter 50 µl/puits.
- xii) Recouvrir les plaques et incubé à 37 °C pendant 60 min.
- xiii) Enlever le conjugué et laver 6 fois les plaques dans du PBST.
- xiv) Ajouter 50 µl/puits de substrat ABTS (acide 2,2'-azino-di-[3-éthyl-benzthiazoline]-6-sulfonique) fraîchement préparé avec du peroxyde d'hydrogène (0,1 %) et incubé à température ambiante pendant 30 min.
- xv) Mesurer l'absorbance à 405 nm. Un échantillon d'analyse est considéré comme positif si l'absorbance de l'échantillon d'essai dans les puits contenant l'antigène du virus est au moins 2 fois l'absorbance du sérum témoin négatif dans les puits contenant l'antigène du virus et au moins 2 fois l'absorbance de l'échantillon analysé en parallèle dans les puits contenant l'antigène témoin.

b) Séroneutralisation par réduction des plages (applicable au sérum de toute espèce)

L'analyse par PRN est effectuée sur des cultures de cellules Vero dans des plaques 6 puits ou des boîtes de 25 cm². Les sérums peuvent être examinés à une dilution finale de 1/10 et 1/100 ou peuvent être titrés pour établir un titre final. Une description de l'analyse en flacons de 25 cm² employant 100 unités formant plages (UFP) de virus s'effectue comme suit.

Avant l'analyse, le sérum est inactivé par la chaleur à 56 °C pendant 30 min et dilué (par exemple 1/5 et 1/50) dans du milieu. La dilution adéquate du virus (200 UFP par 0,1 ml) est préparée dans un milieu contenant 10 % de complément de cobaye. Des volumes égaux du virus et du sérum sont mélangés et incubés à 37 °C pendant 75 min avant inoculation de 0,1 ml sur des plaques de culture de cellules confluentes. L'inoculum est adsorbé pendant 1 h à 37 °C, suivi de l'addition de 4 ml de milieu primaire de recouvrement. Le milieu primaire de recouvrement se compose de deux solutions qui sont préparées séparément. La solution I contient une solution de sels basiques Earle sans rouge de phénol concentrée × 2, 4 % de sérum de veau fœtal, 100 µg/ml de gentamycine et 0,45 % de bicarbonate de soude. La solution II se compose de 2 % d'agar Noble qui est stérilisée et maintenue à 47 °C. Des volumes égaux des solutions I et II sont ajustés à 47 °C et mélangés ensemble juste avant l'utilisation. Les plaques sont incubées pendant 72 h à 37 °C. Une seconde couche de recouvrement de 4 ml préparée comme ci-dessus, mais contenant également 0,003 % de rouge neutre est versée dans chaque flacon. Après une nouvelle incubation durant une nuit à 37 °C, le nombre de plages dues au virus est évalué. Les titres finaux sont basés sur la réduction de 90 % des plages en comparaison aux flacons témoin de virus, qui devraient avoir environ 100 plages.

Les épreuves classiques de microneutralisation ou de neutralisation par réduction de plages en microplaques sont préférables lorsque le volume des échantillons est petit (32).

1 Disponible auprès des Centers for Disease Control and Prevention, Biological Reference Reagents, 1600 Clifton Road NE, Mail Stop C21, Atlanta, Georgia, 30333, États-Unis d'Amérique.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

En février 2003, le Ministère de l'Agriculture des États-Unis (USDA pour *United States Department of Agriculture*) a délivré une autorisation pour un vaccin anti-WNV inactivé au formol dérivé d'une culture de tissus pour utilisation chez les chevaux. En décembre 2003, l'USDA a autorisé un vaccin anti-WNV à base d'un vecteur canarypoxvirus pour utilisation chez les chevaux. En 2004, un vaccin anti-WNV inactivé produit sur une lignée cellulaire humaine et mis au point par Crucell NV (Pays-Bas) et l'Institut vétérinaire Kimron (Israël) a obtenu une autorisation de mise sur le marché en Israël comme vaccin vétérinaire pour les oies. En juillet 2005, l'USDA a autorisé le premier vaccin ADN anti-WNV pour usage chez les animaux aux États-Unis. Le vaccin contient les gènes de deux protéines du WNV, mais aucun virus complet vivant ou inactivé. Fin 2006, un vaccin chimère, avec comme vecteur le virus de la fièvre jaune, a été autorisé par l'USDA pour utilisation chez le cheval. Ces vaccins ont démontré une efficacité et une innocuité suffisantes chez les chevaux correctement vaccinés. La vaccination peut être utile pour prévenir les signes nerveux liés à l'infection du WNV.

Les directives pour la production des vaccins vétérinaires sont données au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les directives données ici et au Chapitre 1.1.8. sont par nature prévues pour être générales et peuvent être complétées par des conditions nationales et régionales.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

L'isolat du WNV utilisé pour la production de vaccins doit être accompagné de la documentation décrivant son histoire d'origine et de passage. L'isolat doit présenter une bonne innocuité chez les animaux hôtes, à l'âge prévu de la vaccination, et assurer une protection après une épreuve virulente.

b) Méthode de culture

Le WNV devrait être propagé dans des lignées de cellules connues pour supporter la croissance du WNV. Les lignées de cellules devraient être exemptes de virus, de bactéries, de champignons, et de mycoplasmes. La propagation virale ne devrait pas excéder 5 passages à partir du lot de semence primaire (MSV pour *Master Seed Virus*), à moins que des passages supplémentaires s'avèrent apporter une protection chez l'animal-hôte.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Le MSV devrait être exempt de bactéries, de champignons et de mycoplasmes. Après examen, le MSV doit être trouvé exempt de virus étrangers, y compris de l'herpèsvirus équin, de l'adénovirus équin, du virus de l'artérite virale équine, du virus de la diarrhée virale bovine, de réovirus, et du virus de la rage par une technique d'immunofluorescence. Le MSV doit être prouvé exempt de virus étrangers par l'absence d'ECP et d'hémadsorption sur la lignée de cellules Vero et sur cellules embryonnaires équines.

Dans une épreuve d'immunogénicité, le MSV destiné à la production à son niveau le plus élevé de passages doit protéger les chevaux sensibles contre une souche d'épreuve virulente. Un nombre statistiquement significatif de chevaux vaccinés doit être protégé d'une virémie, par rapport aux témoins. Des essais de terrain devraient être entrepris pour déterminer l'innocuité du vaccin.

2. Méthode de fabrication

La lignée de cellules sensibles estensemencée dans un récipient approprié. Du milieu essentiel minimum, complété par du sérum de veau fœtal (FBS), est employé comme milieu pour la production. L'incubation est à 37 °C.

Des cultures de cellules sont inoculées directement avec un lot de travail de WNV, généralement issu de 1 à 4 passages à partir du MSV. Les cultures inoculées sont incubées pendant 1 à 8 jours avant de récolter le milieu de culture. Pendant l'incubation, on observe quotidiennement les cultures pour déterminer la présence d'un ECP ou d'une contamination bactérienne.

Les vaccins viraux tués sont chimiquement inactivés au formol ou l'éthylènimine binaire et mélangés à un adjuvant approprié.

La cassette d'expression du vaccin ADN est amplifiée dans *Escherichia coli* en utilisant un vecteur plasmide et purifié avant formulation en tant que vaccin.

3. Contrôle en cours de fabrication

Les lots de production de WNV doivent être titrés en culture de cellules afin de normaliser la production. Les lots ayant un titre faible devraient être concentrés ou corrigés avec les lots de titres élevés afin d'obtenir le titre correct.

Les lots de production de l'ADN sont quantifiés par des méthodes analytiques et caractérisés avant d'être normalisés ; la quantité adéquate d'ADN est incorporée dans le vaccin. Le niveau maximum de contamination du vaccin ADN par le lipopolysaccharide est de 100 UE (UE = unité d'endotoxine).

4. Contrôle des lots

Les échantillons du produit final subissent des analyses de pureté, d'innocuité et d'activité.

a) Pureté

Les échantillons sont examinés pour détecter une contamination bactérienne ou fongique. Pour analyser les bactéries, 10 récipients, chacun contenant 120 ml de milieu de digestion de caséine de soja, sont inoculés avec 0,2 ml de 10 échantillons du récipient final. Les 10 récipients sont incubés entre 30 et 35 °C pendant 14 jours afin d'observer une croissance bactérienne. Pour détecter les champignons, 10 récipients, chacun contenant 40 ml de milieu de digestion de caséine de soja, sont inoculés avec 0,2 ml de 10 échantillons du récipient final. Les 10 récipients sont incubés entre 20 et 25 °C pendant 14 jours afin d'observer une croissance fongique.

b) Innocuité

Les analyses d'innocuité peuvent être réalisées chez les cobayes, souris ou chevaux. Les études de sécurité sur le terrain devraient être entreprises avant que le vaccin ne reçoive l'autorisation finale. D'une façon générale, deux séries devraient être effectuées, dans trois endroits géographiques différents, et sur 600 animaux au minimum. Environ 1/3 des animaux devrait avoir atteint l'âge minimum recommandé pour la vaccination (corrélée avec l'efficacité). Si le produit final est un vaccin modifié vivant, une analyse supplémentaire d'innocuité du MSV est exigée pour démontrer l'atténuation de la virulence.

c) Activité

Afin de déterminer l'efficacité de vaccins à virus tués, des tests de vaccination/sérologie ou de vaccination/épreuve virulente devraient être effectués. Des analyses parallèles telles que les techniques de quantification d'antigènes en ELISA pour comparer un étalon au produit final sont acceptables pour la détermination de l'efficacité relative d'un produit. La norme devrait s'avérer protectrice chez l'animal-hôte (31). Les produits à virus vivants sont titrés en cultures de cellules pour déterminer l'efficacité du produit final. Le titre final au moment de la livraison devrait inclure en plus de la dose protectrice minimum établie dans l'épreuve d'immunogénicité, $0,7 \log_{10}$ pour tenir compte de la variabilité de l'analyse et $0,5 \log_{10}$ pour la stabilité en fin de péremption.

Les vaccins ADN sont testés pour leur activité et pour la quantité d'ADN qu'ils contiennent en utilisant des méthodes de quantification en parallèle qui comparent une préparation de référence au produit final.

d) Durée de l'immunité

Les études concernant la durée d'immunité sont conduites avant que le vaccin ne reçoive l'autorisation finale. La durée devrait couvrir la saison des moustiques dans les zones infectées. Des injections de rappel sont conseillées pour les animaux soumis à un risque élevé et dans les régions infectées dans lesquelles les moustiques sont actifs tout au long de l'année.

e) Stabilité

Tous les vaccins sont initialement délivrés 24 mois avant l'expiration. Des études en temps réel de stabilité sont entreprises pour confirmer la validité de toutes les dates d'expiration.

f) Agents de conservation

Des antibiotiques sont ajoutés pendant la production, généralement du sulfate de gentamycine ou néomycine n'excédant pas 30 µg/ml.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

La vaccination est seulement recommandée pour des chevaux dans les régions infectées par le WNV. Les chevaux vaccinés peuvent développer un titre en anticorps qui peut interférer avec l'autorisation d'exporter le cheval.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir la section C.4.b.

b) Activité

Voir la section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AUSTIN R.J., WHITING T.L., ANDERSON R.A. & DREBOT M.A. (2004). An outbreak of West Nile virus-associated disease in domestic geese (*Anser anser domesticus*) upon initial introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. *Can. Vet. J.*, **45**, 117–123.
2. BEATY B.J., CALISHER C.H. & SHOPE R.E. (1989). Arboviruses. *In: Diagnostic Procedures for Viral Rickettsial and Chlamydial infections*, Sixth Edition, Schmidt N.H. & Emmons R.W., eds. American Public Health Association, Washington DC, USA, 797–856.
3. BERTHET F.-X., ZELLER H.G., DROUET M.-T., RAUZIER J., DIGOUTTE J.-P. & DEUBEL V. (1997). Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J. Gen. Virol.*, **78**, 2293–2297.
4. BIN H., GROSSMAN Z., POKAMUNSKI S., MALKINSON M., WEISS L., DUVDEVANI P., BANET C., WEISMAN Y., ANNIS E., GANDAKU D., YAHALOM V., HINDYIEH M., SHULMAN L. & MENDELSON E. (2001). West Nile fever in Israel 1999–2000: from geese to humans. *Ann. NY Acad. Sci.*, **951**, 127–142.
5. BUNNING M.L., BOWEN R.A., CROPP B.C., SULLIVAN K.G., DAVIS B.S., KOMAR N., GODSEY M., BAKER D., HETTLER D.L., HOLMES D.A., BIGGERSTAFF B.J. & MITCHELL C.J. (2002). Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 380–386.
6. BURKE D.S. & MONATH T.P. (2001). Flaviviruses. *In: Fields Virology*, Fourth Edition, Knipe D.M. & Howley P.M., eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 1043–1125.
7. BURT F.J., GROBBELAAR A.A., LEMAN P.A., ANTHONY F.S., GIBSON G.V.F. & SWANEPOEL R. (2002). Phylogenetic relationships of Southern African West Nile virus isolates. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 820–826.
8. CANTILE C., DI GUARDO G., ELENI C. & ARISPICI M. (2000). Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet. J.*, **32**, 31–35.
9. DAVIS B.S., CHANG G.J., CROPP B., ROEHRIG J.T., MARTIN D.A., MITCHELL C.J., BOWEN R. & BUNNING M.L. (2001). West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses *in vitro* a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Virol.*, **75**, 4040–4047.
10. DAVIS C.T., EBEL G.D., LANCIOTTI R.S., BRAULT A.C., GUZMAN H., SIIRIN M., LAMBERT A., PARSONS R.E., BEASLEY D.W.C., NOVAK R.J., ELIZONDO-QUIROGA D., GREEN E.N., YOUNG D.S., STARK L.M., DREBOT M.A., ARTSOB H., TESH R.B., KRAMER L.D. & BARRETT A.D.T. (2005). Phylogenetic analysis of North American West Nile virus isolates 2001–2004: Evidence for the emergence of a dominant genotype. *Virology*, **342**, 252–265.
11. DEL GIUDICE P., SCHUFFENECKER I., VANDENBOS F., COUNILLON E. & ZELLER H. (2004). Human West Nile virus, France [letter]. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 1885–1886.
12. HAYES C.G. (1989). West Nile fever. *In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. 5, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 59–88.
13. HAYES C.G. (2001). West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **951**, 25–37.

14. HAYES E.B., KOMAR N., NASCI R.S., MONTGOMERY S.P., O'LEARY D.R. & CAMPBELL G.L. (2005). Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1167–1173.
15. HUBALEK Z. & HALOUZKA J. (1999). West Nile fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, **5**, 643–650.
16. JOHNSON D.J., OSTLUND E.N., PEDERSEN D.D. & SCHMITT B.J. (2001). Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 739–741.
17. LANCIOTTI R.S., KERST A.J., NASCI R.S., GODSEY M.S., MITCHELL C.J., SAVAGE H.M., KOMAR N., PANELLA N.A., ALLEN B.C., VOLPE K.E., DAVIS B.S. & ROEHRIG J.T. (2000). Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 4066–4071.
18. MORALES M.A., BARRANDEGUY M., FABBRI C., GARCIA J.B., VISSANI A., TRONO K., GUTIERREZ G., PIGRETTI S., MENCHACA H., GARRIDO N., TAYLOR N., FERNANDEZ F., LEVIS S. & ENRIA D. (2006). West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**, 1559–1561.
19. MURGUE B., MURRI S., ZIENTARA S., DURAND B., DURAND J.-P. & ZELLER H. (2001). West Nile outbreak in horses in Southern France, 2000: The return after 35 years. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 692–696.
20. NIEDRIG M., LINKE S., ZELLER H. & DROSTEN C. (2006). First international proficiency study on West Nile virus molecular detection. *Clin. Chem.*, **52**, 1851–1854.
21. OSTLUND E.N., ANDRESEN J.E. & ANDRESEN M. (2000). West Nile encephalitis. *Vet. Clin. North Am., Equine Pract.*, **16**, 427–441.
22. OSTLUND E.N., CROM R.L., PEDERSEN D.D., JOHNSON D.J., WILLIAMS W.O. & SCHMITT B.J. (2001). Equine West Nile encephalitis, United States. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 665–669.
23. PANTHIER R., HANNOUN C.L., OUDAR J., BEYTOUT D., CORNIOU B., JOUBERT L., GUILLON J.C. & MOUCHET J. (1966). Isolement du virus West Nile chez un cheval de Camargue atteint d'encéphalomyélite. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, **262**, 1308–1310.
24. RICHMOND J.Y. & MCKINNEY R.W., EDS (1999). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Fourth Edition. United States Department of Health and Human Services. US Government Printing Office, Washington DC, USA.
25. SCHMIDT J.R. & EL MANSOURY H.K. (1963). Natural and experimental infection of Egyptian equines with West Nile virus. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **57**, 415–427.
26. SMITHBURN K.C., HUGHES T. P., BURKE A.W. & PAUL J.H. (1940). A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med.*, **20**, 471–492.
27. SNOOK C.S., HYMAN S.S., DEL PIERO F., PALMER J.E., OSTLUND E.N., BARR B.S., DEROSCHERS A.M. & REILLY L.K. (2001). West Nile virus encephalomyelitis in eight horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **218**, 1576–1579.
28. STEELE K.E., LINN M.J., SCHOEPP R.J., KOMAR N., GEISBERT T.W., MANDUCA R.M., CALLE P.P., RAPHAEL B.L., CLIPPINGER T.L., LARSEN T., SMITH J., LANCIOTTI R.S., PANELLA N.A. & McNAMARA T.S. (2000). Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. *Vet. Pathol.*, **37**, 208–224.
29. TEWARI D., KIM H., FERIA W., RUSSO B. & ACLAND H. (2004). Detection of West Nile virus using formalin fixed paraffin embedded tissues in crows and horses: quantification of viral transcripts by real-time RT-PCR. *J. Clin. Virol.* **30**, 320–325.
30. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE (2006). Disease Surveillance Information, West Nile Virus. Available at: URL: <http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/ncas/nsu/surveillance/wnv/wnv.htm>
31. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE, VETERINARY SERVICES ME MORANDUM 800.90 (1998). Guidelines for Veterinary Biological Relative Potency Assays and Reference Preparations Based on ELISA Antigen Quantification. Available at: <http://www.aphis.usda.gov/vs/cvb/vsmemos.htm>

32. WEINGARTL H.M., DREBOT M.A., HUBALEK Z., HALOUZKA J., ANDONOVA M., DIBERNARDO A., COTTAM-BIRT C., LARENCE J. & MARSZAL P. (2003) Comparison of assays for detection of West Nile virus antibodies in chicken sera. *Can. J. Vet. Res.*, **67**, 128–132.
33. ZELLER H.G. & SCHUFFENECKER I. (2004). West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean Basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **23**, 147–156.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la fièvre de West Nile (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

SECTION 2.2.

APIDAE

NOTE D'INTRODUCTION SUR LES MALADIES DES ABEILLES

Les abeilles sont des insectes étroitement apparentés aux fourmis et aux guêpes. Il existe plusieurs milliers d'espèces d'abeilles, la plupart d'entre elles ne sont pas des insectes sociaux et ont une vie solitaire. L'abeille mellifère, genre Apis, vit au sein d'une colonie, qui est une famille d'insectes sociaux. Il existe beaucoup d'espèces, sous-espèces, races et sous-races d'abeilles mellifères, qui sont toutes adaptées à leur environnement.

Deux espèces sont importantes en apiculture – l'abeille occidentale, Apis mellifera et l'abeille orientale Apis cerana. L'abeille africanisée, qui est trouvée en Amérique du Sud, en Amérique Centrale et dans quelques États des États-Unis d'Amérique, est un croisement entre deux sous-espèces d'abeille occidentale, l'abeille européenne et une abeille du sud de l'Afrique (A. mellifera scutellata). Apis cerana occupe une grande partie du Sud et Sud-Est de l'Asie. Les colonies sont petites et dociles, mais les rendements de miel sont bas. Dans un climat approprié, l'abeille occidentale, A. mellifera, est parfois préférée pour sa plus grande production en miel.

Toutes les abeilles apparaissent sensibles aux maladies connues de l'abeille, mais la sensibilité varie en fonction des races. Par exemple, A. cerana est moins sensible à la varroose. Lors du prélèvement dans une colonie d'abeilles, pour le diagnostic des maladies, les abeilles doivent d'abord être tuées avec du diéthyle éther ou dans une chambre de congélation (–20 °C) durant une nuit. Certaines peuvent également être tuées par immersion dans de l'alcool éthylique à 70 %. C'est le cas pour le diagnostic de l'acariose (Acarapis woodi). Des frottis de larves et de nymphes doivent être réalisés pour déterminer les maladies du couvain ou un morceau de cadre de couvain montrant des signes évidents de la maladie peut être envoyé au laboratoire.

*
* *

ACARAPISOSE DES ABEILLES MELLIFÈRES

RÉSUMÉ

*L'acarapisose (connue également sous le nom d'acariose ou de maladie d'acarine) est une maladie de l'abeille mellifère adulte *Apis mellifera* L. et des autres espèces d'*Apis*. Elle est provoquée par l'acarien Tarsonémidé, connus sous le nom d'acarien des trachées, *Acarapis woodi* (Rennie). L'acarien mesure approximativement 150 µm ; c'est un parasite interne du système respiratoire qui vit et se reproduit principalement dans la première paire des trachées thoraciques de l'abeille. Parfois les acariens sont retrouvés dans les sacs aériens de la tête, du thorax et de l'abdomen. Les acariens s'alimentent avec l'hémolymphe de leur hôte.*

Les effets pathogènes trouvés chez les abeilles infectées dépendent du nombre de parasites dans la trachée et ils sont attribuables aux dommages mécaniques et aux désordres physiologiques consécutifs à l'obstruction des conduits d'air, aux lésions dans les parois des trachées, et à la réduction de l'hémolymphe. L'augmentation du nombre de parasites entraîne une opacité et une décoloration des parois des trachées avec des secteurs tachés de noir, probablement dus aux couches de mélanine.

Le taux de mortalité varie de moyen à élevé. Les manifestations précoces d'infection sont normalement inapparentes, elles deviennent évidentes seulement lors de fortes infections. Elles ont lieu habituellement au début du printemps. Les infections se propagent par contact direct. Généralement, une période de 10 jours est nécessaire après le premier contact du parasite pour que les abeilles déclarent l'acarapisose. La reproduction des acariens se produit dans les trachées des abeilles adultes, où les femelles peuvent pondre de 8 à 20 œufs. Il y a 2 à 4 fois plus de femelles que de mâles. L'incubation est de 11 à 12 jours pour les mâles et 14 à 15 jours pour les femelles.

Identification de l'agent pathogène : *la présence du parasite est mise en évidence par des méthodes de laboratoire et de microscopie. Les acariens peuvent être observés à l'intérieur des trachées ou être extraits de celles-ci et observés au microscope. Plusieurs techniques sont disponibles pour démontrer la présence des acariens, tels que la dissection, le broyage et la coloration.*

Les thorax des abeilles suspectes sont disséqués pour exposer la trachée. Chaque trachée est examinée au microscope (x18-20) : les acariens apparaîtront sous la forme de petits corps ovales fixés à la paroi transparente de la trachée.

Lorsque le nombre d'abeilles suspectes le permet, ces dernières peuvent être broyées et homogénéisées dans l'eau ; la suspension est soumise à une filtration grossière et à une centrifugation. Le dépôt est traité avec de l'acide lactique non dilué pendant 10 min. Cette préparation est ensuite montée entre lame et lamelle et examinée au microscope.

Les parasites peuvent être colorés par des techniques histologiques de sorte qu'ils puissent être observés dans la trachée d'abeille. Les trachées sont extraites, éclaircies avec de l'hydroxyde de potassium à 8 %, et colorées avec du bleu de méthylène à 1 %. C'est la méthode la mieux adaptée pour un grand nombre d'échantillons.

Épreuves sérologiques : *il n'existe pas d'épreuves sérologiques applicables pour le diagnostic.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *il n'y a aucun produit biologique disponible. Les cristaux de menthol sous forme de pâtes faites avec de l'huile végétale (graisse non animale) et du sucre blanc en poudre maintiendront les niveaux d'acariens sous des seuils acceptables.*

A. INTRODUCTION

L'acarapisose est une maladie de l'abeille adulte *Apis mellifera* L. et des autres espèces d'*Apis*, provoquée par l'acarien microscopique tarsonémidé, *Acarapis woodi* (Rennie). L'acarien mesure approximativement 150 µm ; c'est un parasite interne du système respiratoire (Figure 1). Ces acariens des trachées entrent, vivent, et se reproduisent principalement dans les grandes trachées prothoraciques de toutes les abeilles, s'alimentant de leur hémolymphe (Figure 2). Parfois ils sont également trouvés dans les sacs aériens de la tête, du thorax et de l'abdomen (6, 18).

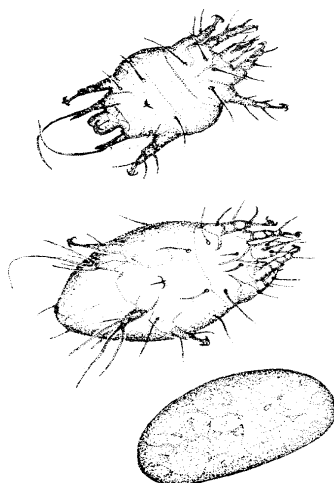


Fig. 1. *Acarapis woodi*, Rennie. En haut : mâle adulte, au centre : femelle adulte, en bas : œuf.

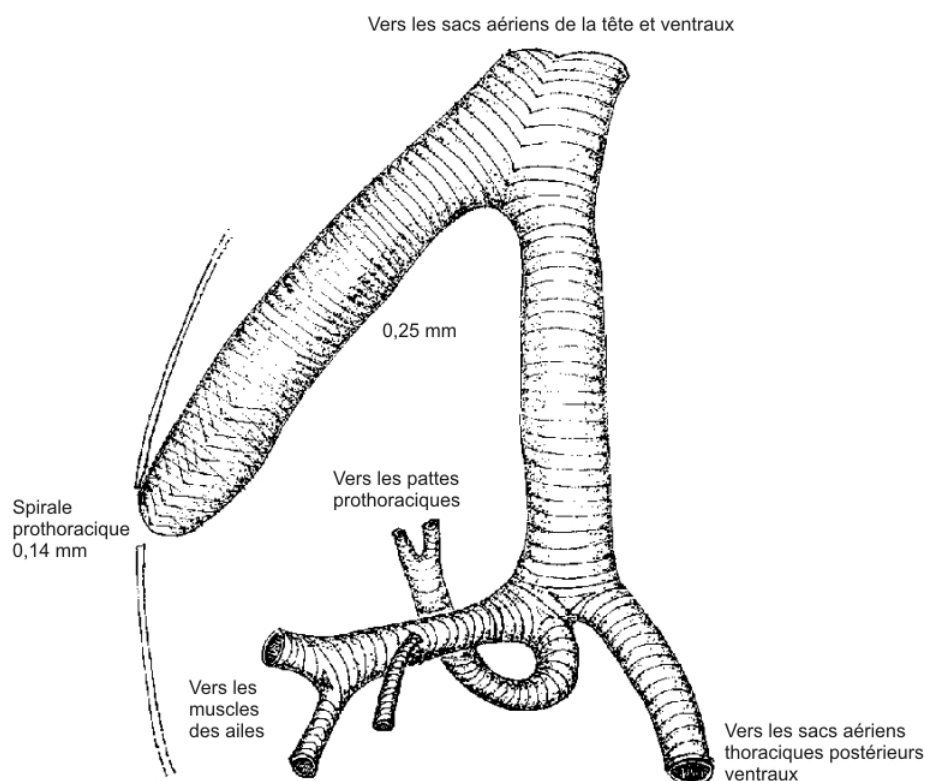


Fig. 2. Trachées thoraciques principales d'abeille où *Acarapis* est généralement trouvé ; lors d'infestations légères, les parasites sont situés près de l'ouverture des spiracles.

Les effets pathogènes sur les individus dépendent du nombre de parasites dans les trachées et sont attribuables aux dommages mécaniques et aux désordres physiologiques consécutifs à l'obstruction des conduits d'air, aux lésions dans les parois des trachées et à la déperdition en hémolymphe. À mesure que la population de parasites augmente, les parois des trachées, normalement blanchâtres et translucides, deviennent opaques et décolorées avec des secteurs tachés de noir, probablement dus aux couches de mélanine (5).

Le taux de mortalité varie de moyen à élevé. Les infections précoces sont, en général, inapparentes, excepté une faible diminution de la taille de la colonie. Seulement, lors de fortes infections la maladie devient évidente. Elles ont lieu habituellement au début du printemps après la période de confinement hivernale où les acariens se sont reproduits et multipliés tranquillement dans des abeilles d'hiver dont la durée de vie est plus longue. Ceci est particulièrement vrai dans l'hémisphère nord où la reproduction des abeilles dépend des variations saisonnières.

L'infection se propage d'une abeille à l'autre par contact direct. Généralement, une période de 10 jours avec le parasite est nécessaire pour que les abeilles marquent des signes cliniques. Les tentatives d'élevage d'*A. woodi* sur des milieux artificiels et synthétiques ont été infructueuses, et l'élevage de ceux-ci sur les stades immatures d'abeille n'a été que partiellement réussi (7). La durée de vie des acariens dans les abeilles mortes est approximativement d'une semaine. La reproduction a lieu dans les trachées des abeilles adultes où les acariens femelles pondent entre 8 à 20 œufs. Il y a 2 à 4 fois plus de femelles que de mâles. L'incubation est de 11 à 12 jours pour les mâles et 14 à 15 jours pour les femelles.

Il n'existe aucun signe clinique fiable pour le diagnostic de l'acarapisose car les signes de l'infection ne sont pas spécifiques et les abeilles infectées se comportent plus ou moins de la même façon que pour d'autres maladies ou intoxications. Elles rampent autour et devant la ruche, grimpent sur les brins d'herbe, incapables de voler et peuvent être atteintes de dysenterie.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

L'acarapisose ne peut être détectée en laboratoire qu'en utilisant un microscope ou par une méthode immuno-enzymatique (ELISA). Il n'y a aucune méthode fiable pour la détection des infections primaires. Le nombre d'abeilles prélevées détermine le seuil de détection de la méthode. Il a été observé qu'un taux de 1 à 2 % d'infection peut être détecté en prélevant 50 abeilles. Des données séquentielles de prélèvement sont disponibles (4, 17). Le meilleur moment pour le prélèvement des échantillons d'abeilles se situe au début du printemps ou à la fin de l'automne (hémisphère nord), lorsque les populations d'*Acarapis* sont les plus fortes. La visualisation des acariens est plus facile sur des abeilles plus âgées, qui ont plus d'acariens. Les castes de reines, de faux-bourçons ou d'ouvrières peuvent être utilisées, mais *Acarapis* préfèrent la caste des faux-bourçons.

a) Dissection (8)

Un échantillon de 50 abeilles (voir au-dessus) est prélevé au hasard à partir de colonies suspectes. Ce sont principalement des abeilles rampantes et incapables de voler, trouvées à 3 mètres devant la ruche. Ceci est préférable à un prélèvement aléatoire à l'intérieur de la colonie. Les abeilles peuvent être vivantes, mourantes, ou mortes. Les abeilles vivantes doivent d'abord être tuées avec de l'alcool éthylique ou dans une chambre de congélation (–20 °C) ; les abeilles ne doivent pas être mortes depuis plus de 2 ou 3 jours ; cependant elles peuvent être conservées jusqu'à 4 semaines à 4 °C ou pendant plusieurs mois à –20 °C. Elles peuvent être préservées indéfiniment dans un fixateur tel que la solution d'Oudemann : acide acétique glacial (80 ml) ; glycérol (50 ml) ; et éthanol à 70 % (870 ml).

- **Protocole : préparation directe (15, 18)**

- i) Séparer l'abdomen du thorax (voir Figure 3) ;
- ii) Prélever le thorax avec des éléments de la tête et examiner à la loupe binoculaire (agrandissement de 20 à 30 fois) ;
- iii) Retirer le sclérite pleural du premier segment thoracique ainsi que la première paire de pattes à l'aide d'une paire de pinces. Les conduits principaux de la branche thoracique et des branches céphaliques de la trachée sont alors visibles à travers l'orifice circulaire ;
- iv) À l'aide d'une paire de pinces très fines, retirer le tergite thoracique du premier segment thoracique et une partie du deuxième tergite thoracique. Après avoir retiré la musculature superficielle, les deux trachées thoraciques sont mises en évidence. Un diagnostic positif est porté quand on observe soit une mélanisation d'une des deux trachées soit, en cas d'infestation légère, la présence de corps ovales translucides (œufs, etc.) aisément visibles à travers les trachées ;

- v) Pour un examen microscopique approfondi (c.-à-d. pour la confirmation d'une infestation légère), il convient de retirer les trachées et de les déposer sur une lame avec une goutte d'eau. Au microscope avec un grossissement de 100 fois, les parasites adultes et les divers stades de développement sont facilement distingués.

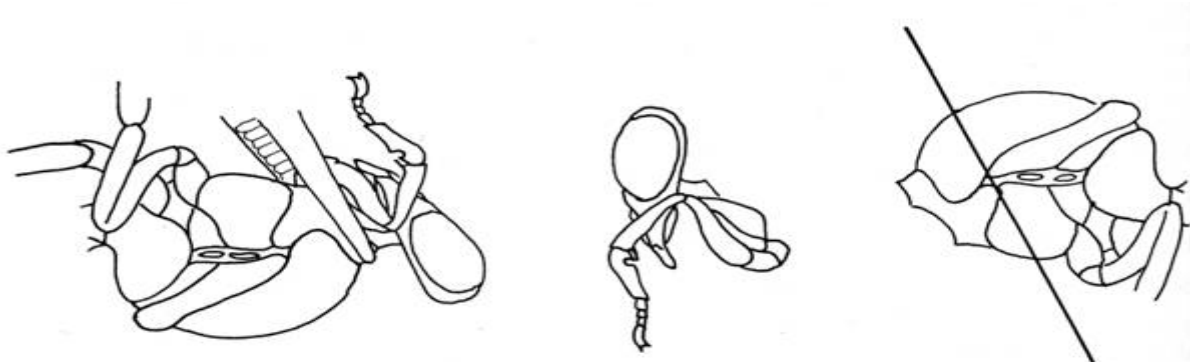


Fig. 3. Préparation des abeilles en vue de la mise en évidence d'*Acarapis woodi* dans la première paire des trachées thoraciques.

• **Protocole : macération (15)**

- i) Poser et maintenir les abeilles sur le dos ou les tenir entre le pouce et l'index ;
- ii) Couper les têtes et les pattes antérieures à l'aide d'un petit ciseau et enlever la membrane intersegmentaire entourant l'ouverture du cou pour exposer les trachées (Figure 4). Vérifier les trachées au plus près du spiracle (les acariens entrent par le spiracle) pour observer des infestations faibles. Les fortes infestations sont facilement visibles car l'on peut observer des ombres ou des corps foncés dans l'espace libre des trachées brun foncé. Des infestations anciennes et importantes vont faire brunir voire noircir les trachées ;
- iii) Couper le thorax entre la deuxième paire de pattes et la base du mésothorax avec un scalpel pointu. Ces disques minces peuvent encore être traités pour éclaircir les tissus musculaires ;
- iv) Faire macérer les disques soit en chauffant doucement dans une solution à 8 % d'hydroxyde de potassium pendant approximativement 20 min soit en les laissant sans chauffage durant toute une nuit ;
- v) Examiner la première paire de trachées, recouverte par le tissu musculaire, au microscope au grossissement $\times 18$ à 20, ou transférer les trachées sur une autre lame, ajouter de la glycérine ou de l'eau et observer avec un plus fort grossissement ;
- vi) Les acariens sont facilement observables sur la paroi transparente en tant que petits corps ovoïdes.

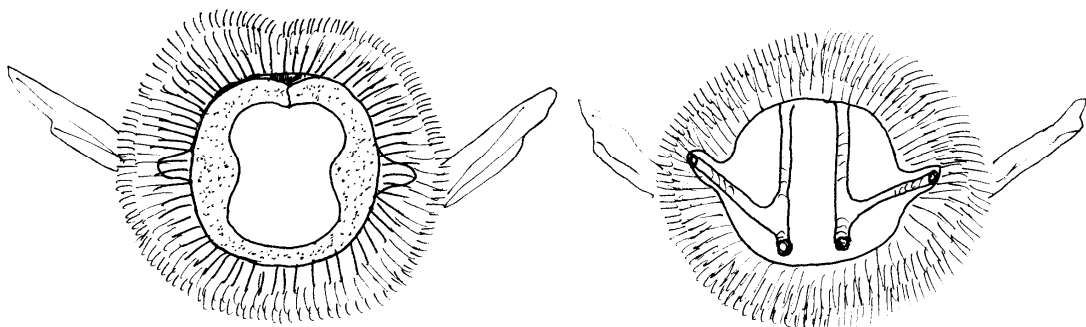


Fig. 3.

vue de face du thorax d'abeille la tête étant coupée et la membrane intersegmentaire du cou intacte

sans la membrane intersegmentaire du cou, trachées exposées au niveau des ouvertures des spiracles

Cette technique est la plus simple et la plus fiable pour le diagnostic de l'acarapiose, elle permet la détection précoce d'infection et permet d'établir le taux d'infection. Même des infections faibles peuvent être détectées à l'aide d'un microscope disséquant avec cette technique. Seulement pour des cas isolés, il sera nécessaire d'utiliser des grossissements optiques plus élevés pour faire le diagnostic. Cependant, il s'agit d'une technique exigeante, particulièrement lorsque un grand nombre de diagnostics doit être effectué. Si le

but est seulement de distinguer une infection forte d'une infection légère ou une colonie non infectée, la dissection peut être arrêtée à l'étape ii) et à la couleur des trachées observées.

b) Broyage (3)

Un échantillon d'environ 200 abeilles est collecté au hasard dans la colonie suspecte. Les ailes et les pattes de chaque abeille sont découpées du thorax, et les thorax seuls sont rassemblés dans un récipient de 100 ml contenant un quart d'eau. Cette suspension est homogénéisée 3 fois, chaque fois pendant plusieurs secondes à 10 000 tr/min dans un homogénéisateur. La suspension résultante est passée au travers d'un filtre (maille 0,8 mm) qui est rincé avec approximativement 50 ml d'eau. L'éluat est centrifugé à 1 500 *g* pendant 5 min et le surnageant est jeté. Quelques gouttes de solution non diluée d'acide lactique sont ajoutées au culot, qui contient les acariens. Le culot est incubé pendant 10 min pour permettre aux fibres musculaires de se dissoudre, puis monté entre lame et lamelle pour l'examen au microscope. Cette technique est plus rapide que la dissection, mais est moins précise. Les acariens externes *A. externus*, *A. vagans* et *A. dorsalis*, qui sont morphologiquement semblables aux *A. woodi*, sont souvent trouvés sur le thorax des abeilles saines et peuvent très facilement être confondus avec *A. woodi*. (Tableau 1). Il semble, cependant, qu'ils ne causent aucune menace sérieuse pour les abeilles ou l'apiculture. Cette méthode devrait être choisie seulement pour évaluer approximativement le degré d'infection d'une région. Elle n'est pas appropriée pour déterminer une infection primaire.

Tableau 1. Différences observées entre les espèces d'Acarapis (15)

Critères	<i>A. dorsalis</i>	<i>A. externus</i>	<i>A. woodi</i>
Sillon ventral coxal	Profond	Court	Plat
Espace entre les stigmates	16,7 µm	16,8 µm	13,9 µm
Longueur du tarse (4 ^e paire de pattes)	7,6 µm	11,4 µm	7,5 µm

c) Coloration (11)

Les acariens et les trachées peuvent être colorés spécifiquement, les rendant facilement visibles en microscopie.

• Protocole

- i) Couper la tête et les pattes ;
- ii) Faire une coupe transversale à travers la surface membraneuse derrière les pattes antérieures ;
- iii) Faire une deuxième coupe transversale devant la deuxième paire de patte à la base des ailes antérieures ;
- iv) Pour dissocier les coupes (1 à 1,5 mm d'épaisseur), les placer dans une solution à 8 % d'hydroxyde de potassium ;
- v) Remuer et chauffer doucement près du point d'ébullition pendant approximativement 10 min jusqu'à ce que les tissus internes soient dissous et dégagés, laissant les tissus chitineux intacts ;
- vi) Récupérer les coupes par filtration et les laver à l'eau ;
- vii) Colorer et monter les coupes ;
- viii) Examiner les acariens par microscopie en faible grossissement.

Des montages permanents entre lames et lamelles sont préparés par les techniques histologiques habituelles.

Les colorations cationiques sont les plus spécifiques car elles colorent fortement les acariens et laissent les trachées faiblement colorées. Une solution de bleu de méthylène aqueux à 1 % est la plus appropriée : dissoudre le bleu de méthylène puis ajouter le chlorure de sodium pour faire une solution de NaCl à 0,85 %.

- **Protocole**

- i) Coloration au bleu de méthylène aqueux à 1 % ;
- ii) Différencier les sections avec de l'eau distillée pendant 2 à 5 min ;
- iii) Rincer les sections dans l'alcool à 70 %.

Lorsqu'ils sont maintenus dans l'éthanol à 95 %, les acariens garderont la coloration pendant 6 h (1). Il est essentiel, avec cette technique de faire macérer efficacement les tissus dans la solution d'hydroxyde de potassium. En utilisant cette méthode, il est possible de traiter rapidement et commodément un grand nombre d'échantillons.

d) Méthode immuno-enzymatique

Un test ELISA pour les acariens des trachées a été développé (9, 13, 14). Ce test peut produire des résultats faux-positifs. Il est donc seulement recommandé pour des examens préliminaires. Une autre méthode est la visualisation de la guanine, un déchet azoté produit par les acariens (12).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'existe aucun produit biologique disponible. Les cristaux de menthol (50 g pour une forte colonie) permettent de contrôler les acariens dans la mesure où ils sont laissés dans la colonie pendant 28 jours et à condition que la température ambiante soit au moins de 18 °C. La gamme de température optimale pour que les vapeurs soient efficaces est comprise entre 27 à 29 °C. Les pâtes faites avec de la matière grasse végétale (par exemple margarine, graisse non animale) et du sucre blanc en poudre maintiendront les niveaux d'acarien à 10 %. La pâte (environ 100 g) devra être placée sur le haut des cadres de couvain en automne et au début du printemps (16). L'acide formique peut être employé pour traiter les colonies infectées (10).

Quelques races d'abeilles, telles que les abeilles Buckfast (2) avec un comportement plus hygiénique, sont moins sensibles aux attaques par *Acarapis woodi*.

REMERCIEMENTS

Les Illustrations sont de Diana Sammataro et Wolfgang Ritter, et sont reproduites avec leur permission.

Une publication de la FAO, « Honey bee diseases and pests: a practical guide », W. Ritter & P. Akkratanakul (eds). Agricultural and Food Engineering Technical Report No. 4. FAO, Rome, Italy, 42 pp. ISSN 1814-1137 TC/D/A0849/E, est disponible gratuitement à l'adresse internet suivante : http://www.fao.org/WAICENT/faoINFO/AGRICULT/ags/subjects/en/industFoodAg/pdf/AGST_techrep_4.pdf

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BANCROFT J.D. & STEVENS A. (1982). Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK.
2. BROTHER A. (1968). 'Isle of Wight' or acarine disease: its historical and practical aspects. *Bee World*, **49**, 6-18.
3. COLIN M.A., FAUCON J.P., GIANFERT A. & SARRAZIN C. (1979). A new technique for the diagnosis of Acarine infestation in honey bees. *J. Apic. Res.*, **18**, 222–224.
4. FRAZIER M.T., FINLEY J., HARKNESS W. & RAJOTTE E.G. (2000). A sequential sampling scheme for detecting infestation levels of tracheal mites (Heterostigmata: Tarsonemidae) in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *J. Economic Entomol.*, **93** (3), 551.
5. GIORDANI G. (1964). Recherches au laboratoire sur *Acarapis woodi* (Rennie), agent de l'acariose des abeilles (*Apis mellifera* L.). Note 3. *Bull. Apic.*, **7**, 43–60.

6. GIORDANI G. (1965). Recherches au laboratoire sur *Acarapis woodi* (Rennie), agent de l'acariose des abeilles (*Apis mellifera* L.). Note 4. *Bull. Apic.*, **8**, 159–176.
7. GIORDANI G. (1970). Ricerche di laboratorio su *Acarapis woodi* (Rennie), agente dell'acarosi delle api mellifiche (*Apis mellifera* L.) Nota 6. *Ann. Acc. Naz. Agric.*, **90**, 69–76.
8. GIORDANI G. (1974). Méthodes de diagnostic des maladies des abeilles adultes. Diagnostic de l'acariose. *Bull. Apic.*, **17**.
9. GRANT G., NELSON D., OLSEN P. & RICE W.A. (1993). The ELISA detection of tracheal mites in whole honey bee samples. *Am. Bee J.*, **133**, 652–655.
10. HOOD W.M. & MCCREADIE J.W. (2001). Field tests of the Varroa Treatment Device using formic acid to control Varroa destructor and Acarapis woodi. *J. Agric. Urban Entomol.*, **18** (2), 87.
11. PENG Y. & NASR M.E. (1985). Detection of honey bee tracheal mites (*Acarapis woodi*) by simple staining techniques. *J. Invertebr. Pathol.*, **46**, 325–331.
12. MOZES-KOCH R. & GERSON U. (1997). Guanine visualization, a new method for diagnosing tracheal mite infestation of honey bees. *Apidologie*, **28**, 3–9.
13. RAGSDALE D. & FURGALA B. (1987). A serological approach to the detection of *Acarapis woodi* parasitism in honey bees using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Apidologie*, **18**, 1–10.
14. RAGSDALE D. & KJER K.M. (1989). Diagnosis of tracheal mite (*Acarapis woodi* Rennie) parasitism of honey bees using a monoclonal based enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. Bee J.*, **129**, 550–553.
15. RITTER W. (1996). Diagnostik und Bekämpfung der Bienenkrankheiten (Diagnosis and control of bee diseases). Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Germany.
16. SAMMATARO D. & NEEDHAM G.R. (1996). Host-seeking behaviour of tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) on honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Exp. Appl. Acarol.*, **20**, 121–136.
17. TOMASKO M., FINLEY J., HARKNESS W. & RAJOTTE E. (1993). A sequential sampling scheme for detecting the presence of tracheal mite (*Acarapis woodi*) infestations in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Penn. State Agric. Exp. Stn Bull.*, 871.
18. WILSON W.T., PETTIS J.S., HENDERSON C.E. & MORSE R.A. (1997). Tracheal mites. In: Honey Bee Pests, Predators and Diseases, Third Edition. Al Root publishing, Medina, Ohio, USA, pp 255–277.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour les maladies des abeilles (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

LOQUE AMÉRICAINE DES ABEILLES MELLIFÈRES

RÉSUMÉ

*La loque américaine affecte les stades larvaires de l'abeille mellifère *Apis mellifera* et d'autres espèces d'*Apis*. Elle est présente dans le monde entier. *Paenibacillus larvae*, l'agent causal, est une bactérie qui peut produire plus d'un milliard de spores par larve infectée. Ces spores sont extrêmement résistantes à la chaleur et aux agents chimiques, et elles peuvent survivre pendant plusieurs années sur les écailles dans les couvains morts après infection, produits des ruches et matériel. Seules les spores provoquent la maladie.*

Identification de l'agent pathogène : les cadres de couvain des colonies infectées ont un aspect en mosaïque dû à un mélange d'alvéoles operculées de couvain sain, d'alvéoles non operculées contenant les restes des larves malades, et des alvéoles vides. Ceci n'est pas caractéristique de la loque américaine. Les opercules d'un alvéole de larve malade apparaissent mous et plus foncées, devenant concaves et souvent perforées à mesure que l'infection progresse. La couleur des larves et des pupes passe du brun crémeux au brun foncé avec un aspect visqueux une fois exposés à l'extérieur. Dans certains cas, les résidus de larves sont aqueux. Une odeur caractéristique se développe à un stade avancé d'infection. Le couvain malade se dessèche par la suite pour former des écailles caractéristiques très adhérentes au fond de l'alvéole. La formation d'une larve filante est un des signes les plus caractéristiques de la maladie, il précède la formation des écailles.

*Le diagnostic de la loque américaine est basé sur les signes cliniques et l'identification de l'agent pathogène. Pour l'examen, on peut disposer d'une gamme étendue de prélèvements. Cependant, en pratique, les prélèvements de choix varient selon que le diagnostic concerne une ruche/colonie suspecte ou malade ou entre dans le cadre d'un programme de suivi et de prévention de la loque américaine. Certaines des méthodes d'identification nécessitent une étape préalable de culture tandis que d'autres peuvent être réalisées directement sur les prélèvements. Quatre milieux de culture gélosés sont recommandés : le PLA (*Paenibacillus larvae* agar), la gélose MYPGP, la gélose BHIT et la gélose au sang de mouton de Colombie. Deux réactions d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sont décrites dans ce chapitre. Le premier protocole peut être utilisé pour une confirmation rapide de la loque américaine clinique et pour l'identification des colonies bactériennes après une étape de culture. Le deuxième protocole est celui d'une PCR nichée qui permet une analyse directe d'une solution de spores. L'analyse des caractéristiques biochimiques de *P. larvae* repose sur le test à la catalase, la fermentation des sucres et l'hydrolyse de la caséine. En outre, des techniques basées sur l'emploi d'anticorps et l'identification au microscope de l'agent pathogène sont décrites.*

Épreuves sérologiques : il n'existe pas d'épreuves sérologiques applicables pour le diagnostic.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : les anticorps polyclonaux et monoclonaux pour la mise au point de tests de diagnostic doivent être suffisamment spécifiques.

A. INTRODUCTION

La loque américaine est une maladie infectieuse du couvain d'abeille domestique *Apis mellifera* et des autres espèces d'*Apis*, et est présente partout dans le monde où l'apiculture existe. *Paenibacillus larvae*, l'agent causal, est une bactérie Gram positive qui peut produire plus d'un milliard de spores par larve infectée. La bactérie est en forme de bâtonnet arrondi, droit ou/et parfois incurvé, avec une taille variable (0,5 µm de large par 1,5 à 6 µm de long), apparaissant seule ou en chaînes filamenteuses ; certaines souches sont mobiles. Les sporanges *in vitro* sont souvent clairsemés, et ellipsoïdaux, avec des spores centrales et subterminales, qui peuvent faire gonfler les

sporanges. Les spores sont souvent trouvées libres (16). Les spores sont extrêmement thermostables et résistantes aux agents chimiques. Seules les spores sont capables d'induire la maladie.

L'infection peut être transmise aux larves par des abeilles nourrices ou par des spores restantes à la base d'une alvéole de couvain. Bien que les stades larvaires d'ouvrières, de faux-bourçons et de reines soient susceptibles de déclarer la maladie, on observe rarement des larves infectées de reines et de faux-bourçons dans les conditions naturelles. La sensibilité des larves à la loque américaine diminue avec l'augmentation de l'âge (35) ; les larves ne peuvent plus être infectées après 53 h suivant l'éclosion de l'œuf. La dose létale moyenne (DL_{50} = nombre de spores avec lequel 50 % des larves sont tuées) requise pour déclencher l'infection, bien que très variable, est de 8,49 spores dans des larves d'abeilles âgées de 24 à 48 h (14). L'échange des cadres de couvain contenant des restes de larves malades est la voie de diffusion de la maladie la plus commune. En outre, l'alimentation ou le pillage de miel chargé en spores, le pain d'abeille, les paquets d'abeille et l'introduction de reines provenant de colonies infectées peut également disséminer la maladie. La cire contaminée par des spores de *P. larvae* utilisée pour la création de nouveaux cadres de ruche peut aussi disséminer la maladie. La détection précoce de la loque américaine permet de stopper sa diffusion.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Le diagnostic de la loque américaine est uniquement basé sur l'identification de l'agent pathogène. Pour l'examen, on peut disposer d'une gamme étendue de prélèvements. Cependant, en pratique, les prélèvements de choix varient selon que le diagnostic concerne une ruche/colonie suspecte ou malade ou entre dans le cadre d'un programme de suivi et de prévention de la loque américaine. Un tableau clinique de la maladie est présenté dans ce chapitre, ainsi que les méthodes d'identification qui nécessitent une étape préalable de culture, tandis que d'autres peuvent être réalisées directement sur les prélèvements. Les techniques incluent la caractérisation microbiologique et biochimique, l'amplification en chaîne par polymérase (PCR), des techniques basées sur les anticorps et la microscopie. Il convient de garder présent à l'esprit qu'il existe des différences dans la sensibilité entre ces différentes approches et la technique la plus appropriée devra être choisie en fonction de la situation.

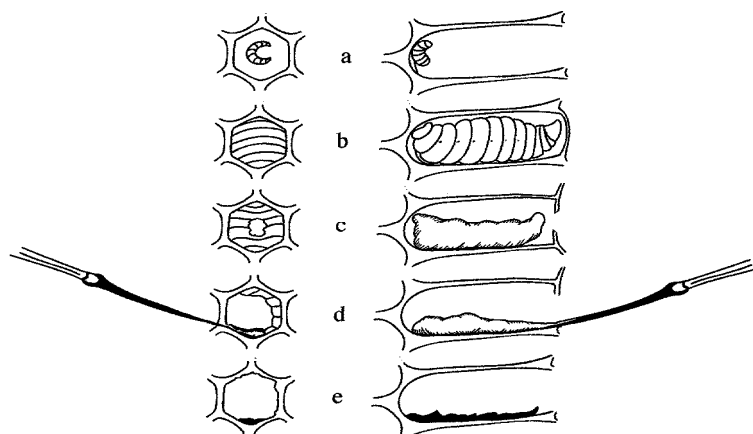


Fig. 1 : Progression de la maladie : (a) Commencement de l'infection (b) Développement larvaire au stade de pupa (c) Le contenu de l'alvéole operculé est réduit, l'opercule est affaissé et perforé (d) Le contenu des alvéoles devient visqueux (e) Écailles résiduelles très adhérentes au fond de l'alvéole.

a) Épizootologie et signes cliniques

Les spores de *P. larvae* peuvent survivre dans les produits de la ruche (miel, cire, écailles de larves) et dans l'environnement pendant 3 à 10 ans et des spores purifiées peuvent même survivre jusqu'à 70 ans (29).

Les signes cliniques de la loque américaine sont très variés et dépendent du génotype impliqué, du stade de la maladie et de la force de la ruche (et sa résistance éventuelle à la loque américaine). Les jeunes larves peuvent être tuées rapidement quand elles sont pelotonnées dans des alvéoles non operculées. Les ouvrières vont éliminer ces larves mortes et seul restera un alvéole vide (4). D'autres larves vont mourir à un stade plus avancé de leur

développement, quand elles sont en position verticale et qu'elles remplissent presque tout l'alvéole du couvain. Souvent, les larves ou les pupes meurent après l'operculation des alvéoles.

Dans les colonies sévèrement infectées, un couvain en mosaïque apparaît avec juxtaposition de couvains d'âges différents, de restes de larves malades, et des alvéoles vides. L'alvéole operculée qui contient une larve malade semble moite et de couleur plus foncée et devient concave et perforée lorsque l'infection progresse. En outre, la larve ou les nymphes changent de couleur, d'abord en brun crémeux puis en brun foncé. Les larves deviennent filantes, et, lorsqu'on introduit dans l'alvéole une sonde, on en retire une masse élastique correspondant aux restes larvaires (test de l'allumette). Ce test est probablement la meilleure technique pour un diagnostic de terrain, mais dans certains cas les restes larvaires sont plutôt aqueux ce qui donne un test de l'allumette négatif. Finalement, après 1 mois ou plus, les restes du couvain malade se dessèchent pour former des écailles typiques dures, brunâtres qui sont fragiles et très adhérentes sur les côtés inférieurs de l'alvéole (Fig. 1). Si la mort se produit au stade de pupa, il peut y avoir formation de la « langue pupale » (une saillie de la tête de la pupa qui traverse le dessus de l'alvéole ou, au contraire, pointer vers la fond de l'alvéole) ; cette langue est l'un des signes les plus caractéristiques de la maladie, bien qu'il soit rarement observé (Fig. 2). La langue peut persister également sur l'écaille sèche. Pour le diagnostic différentiel, il faut tenir compte de la loque européenne.

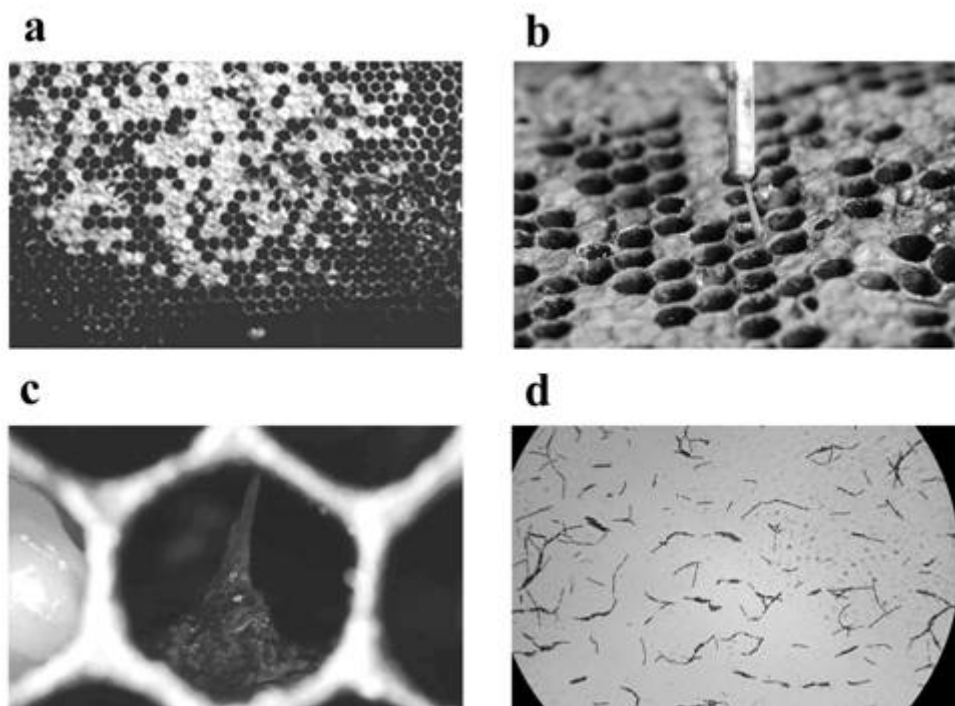


Fig. 2. : Signes clinique de loque américaine (a-c) et coloration de Gram (d) : (a) Cadre de couvain en mosaïque ; (b) Une allumette extrait une masse élastique brunâtre, fil visqueux de restes larvaires semi-fluides ; (c) La formation d'une langue pupale est un signe très caractéristique, mais rarement observé ; (d) L'examen au microscope des colonies isolées indique la présence de bâtonnets Gram positifs, isolés ou en chaînes.

b) choix des échantillons

i) Prélèvement d'échantillons à partir de ruches ou d'essaims suspects ou infectés

Quand on observe les signes typiques de la maladie au rucher, il est recommandé d'envoyer au laboratoire un morceau de cadre de couvain d'environ 20 cm², contenant autant de couvain mort et décoloré que possible. Une personne expérimentée peut aussi récolter les restes de larves ou de pupes infectées directement à partir des alvéoles à l'aide d'un écouvillon stérile, ce qui réduit considérablement la taille de l'échantillon et facilite le conditionnement et le transport de l'échantillon au laboratoire (voir ci-dessous). Quand l'examen microscopique est la méthode retenue, des frottis des restes de larves malades peuvent aussi être réalisés auprès de la ruche (17). Après séchage à l'air, ils sont envoyés au laboratoire.

Toutes les ruches à proximité de la ruche atteinte doivent être considérées comme suspectes et un grand nombre d'échantillons doit être prélevé pour confirmation. En plus des échantillons sur le couvain, d'autres prélèvements peuvent être utilisés pour rechercher la présence de *P. larvae* : aliments (miel [27, 34], pollen [12], gelée royale), ouvrières adultes (21) et débris de cire (32). Des

échantillons de miel peuvent être récoltés dans les alvéoles proches en utilisant différentes cuillères pour éviter les contaminations croisées ; cependant, le miel peut avoir séjourné plusieurs mois sur le cadre avant le prélèvement. Des abeilles adultes peuvent être récoltées par secousse ou brossage du cadre du couvain directement dans un sac en plastique ou dans tout autre récipient. Pour obtenir une image exacte de la situation, des abeilles du couvain (et non pas seulement des alvéoles à mie du dessus) doivent être analysées. Des débris de cire peuvent être récoltés toute au long de l'année au fond de la ruche.

ii) Prélèvement d'échantillons pour les programmes de suivi ou de prévention de la loque américaine

Pour éviter la dispersion des couvains malades, des échantillons de miel, d'abeilles adultes et de débris peuvent permettre la détection de la loque américaine dans des essaims où aucun signe clinique n'est observé. Des prélèvements systématiques à partir de colonies ou du miel récolté font partie des programmes opérationnels ou régionaux de détection de la loque américaine.

L'examen au microscope de frottis de larves ne présentant pas de signes cliniques est nettement moins sensible pour la détection des spores dans les colonies que l'examen bactériologique ou la PCR. En fait la bactériologie et la PCR peuvent souvent détecter les spores dans des colonies qui n'ont jamais développé de symptômes. Cependant, la mise en évidence d'un grand nombre de spores par les méthodes bactériologiques permet de prédire l'apparition d'une loque américaine clinique dans la colonie ou dans le rucher.

c) Conditionnement et transport des échantillons vers le laboratoire

L'échantillon de couvain doit être enveloppé dans un sac en papier, du papier absorbant ou du papier journal et placé dans un carton épais ou une boîte en bois pour le transport. Les écouillons avec des restes de larve peuvent être envoyés dans des tubes à essai avec bouchon. Des portoirs pour les lames de microscope sont disponibles dans le commerce. Pendant le transport, les abeilles adultes peuvent être conservées congelées ou plongées dans de l'éthanol à 70 %, mais des abeilles desséchées sont aussi utilisables. Les aliments sont placés dans un tube, dans un flacon approprié ou dans un sac en plastique avec la cuillère. Il convient d'éviter les fuites et les contaminations croisées. Dans la mesure du possible, les prélèvements de matériel frais devraient être envoyés au laboratoire sous froid.

d) Préparation des échantillons

i) Échantillons pour culture

Une suspension aqueuse de spores de *P. larvae* est en général préparée pour l'ensemble des analyses. Cette suspension est chauffée brutalement à 80 °C pendant 10 min. ou à 95 - 96 °C pendant 3 ou 4 min afin d'éliminer les autres bactéries sporulantes.

Les restes de larves ou de pupes provenant des cadres du couvain sont récoltés avec un écouillon stérile et remis en suspension dans 5 à 10 ml d'eau stérile ou de sérum physiologique (tampon phosphate ou salin à 0,9 % de NaCl dans un tube à essai).

La présence de spores dans les échantillons de miel est contrôlée en chauffant les échantillons à 45 - 50 °C et en les agitant pour mélanger les éventuelles spores. La dilution avec un volume équivalent (25 ml) d'eau permet une manipulation plus facile. Le miel dilué est transféré dans un boudin à dialyse de 44 mm de largeur qui a été fermé à une extrémité. L'extrémité ouverte est fermée après remplissage. Les boudins sont submergés dans l'eau courante pendant 18 h ou dans un bain d'eau renouvelé 3 à 4 fois pendant le même laps de temps. Après dialyse, le contenu est centrifugé à 2 000 *g* pendant 20 min. Le surnageant est éliminé laissant approximativement 1 ml (ou moins) de résidu dans chaque échantillon. Le dépôt est alors remis en suspension dans 9 ml d'eau (31).

L'étape de dialyse peut être supprimée si le miel est préparé pour culture, cependant dans ce cas la centrifugation doit être plus longue (30 min) et plus rapide (3 000 *g*). De même, le volume dans lequel le culot est remis en suspension peut être beaucoup plus petit (200 µl) afin d'améliorer la sensibilité du test (6).

L'ensemencement direct du miel dilué (27) est fréquemment utilisé mais la sensibilité est moins élevée qu'après centrifugation puisque seulement une petite partie du volume total est ensemencée. Quelle que soit la méthode retenue, quand une analyse quantitative est envisagée sur le miel et que des valeurs seuil ont été établies, la méthodologie utilisée pour établir ces valeurs doit toujours être strictement suivie.

Un filtrat de pollen peut être obtenu en dispersant soigneusement 1 g de pollen dans 10 ml (volume final) d'eau distillée stérile et en filtrant à travers du papier Whatman n°1 (12).

Quand des abeilles adultes sont envoyées dans de l'éthanol, celui-ci doit être décanté et remplacé par de l'eau stérile ou du sérum physiologique avant broyage.

Les débris et la cire (1,5 g) doivent être dissous dans un solvant organique (10 ml) : toluène (32), chloroforme (19), ou éther diéthylique (28). La partie liquide (2 ml) est alors diluée dans une solution physiologique (6 ml). Après agitation vigoureuse, la suspension est immédiatement ensemencée sans chauffage (32). Dans un autre protocole, la cire est d'abord diluée dans de l'eau (cire/eau = 1/10) et chauffée à 90 °C pendant 6 min. Après refroidissement, le solvant organique est ajouté (solvant organique/eau = 1/9) et le mélange est agité doucement. Après 2 min où le mélange est laissé au repos, la fraction aqueuse contenant les spores de *P. larvae* se dépose (28).

ii) Échantillons pour PCR

Les suspensions de cellules/spores et les suspensions de spores seules doivent être différenciées, les deuxièmes nécessitant une étape d'extraction de l'ADN plus complexe (excepté pour la PCR nichée).

Si, après l'étape de culture, la PCR est utilisée dans le but d'une identification des colonies bactériennes (= suspension de cellules/spores), le traitement préalable est le suivant : une colonie est mise en suspension dans 50 µl d'eau distillée et chauffée à 95 °C pendant 15 min. Après centrifugation à 5 000 *g* pendant 5 min, 1 à 5 µl du surnageant sont utilisés comme matrice d'ADN dans un mélange pour PCR de 50 µl (9).

Lors d'une confirmation rapide d'un diagnostic clinique de loque américaine, les échantillons sont préparés comme suit : les restes de deux larves malades (= suspension de cellules/spores) sont mises en suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile et mélangées soigneusement. 100 µl de cette suspension sont dilués dans 900 µl d'eau distillée. Cette suspension est agitée sur vortex et 100 µl sont utilisés pour extraire l'ADN par chauffage et centrifugation (voir ci-dessus) (9).

Toutes les solutions aqueuses résultant d'échantillon de miel, d'abeilles adultes, de débris, de cire, de pollen, et de gelée royale doivent être considérées comme une suspension de spores. Dans ce cas, l'extraction de l'ADN nécessite une autre approche. Les suspensions de spores sont ainsi centrifugées à 6 000 *g* et à 4 °C pendant 30 min. Puis le culot est soumis à un traitement de micro-ondes pendant 5 min. à la puissance maximum afin de casser les spores et l'ADN libéré est mis en suspension dans 30 µl de tampon 10 mM Tris/HCl, pH 8, contenant 1 mM d'EDTA (26).

Quand les spores sont à rechercher dans le miel, l'ADN est dilué en série dans de l'eau distillée afin d'éliminer l'effet inhibiteur de la PCR dû au miel (26). Une autre méthode d'extraction de l'ADN, basée sur l'utilisation du lysozyme et de la protéinase K, a été décrite (3).

De bons résultats peuvent aussi être obtenus en incubant le culot d'une suspension de spores dans du bouillon MYPGP à 37 °C entre 2 et 24 h. Par la suite, la suspension est centrifugée à 14 500 *g* pendant 5 min, lavée avec de l'eau distillée et le culot est remis en suspension dans 200 µl d'eau distillée stérile. Cette étape courte d'incubation entraîne la germination des spores ce qui les rend sensibles à un nouveau traitement à la chaleur (voir ci-dessus) (20).

Quand la technique de PCR nichée est retenue, la suspension de spores doit seulement être portée à ébullition à 100 °C pendant 10 min puis centrifugée à 14 500 *g* pendant 2 min. Le surnageant peut servir immédiatement comme matrice ADN pour la PCR nichée (20).

d) Culture

Plusieurs milieux de culture pour *P. larvae* ont été décrits mais les meilleurs résultats ont été obtenus avec le PLA (Paenibacillus larvae agar) (30), la gélose MYPGP (l'abréviation vient de ses constituants : bouillon Mueller-Hinton, yeast extract [extrait de levure], phosphate de potassium, glucose et pyruvate) (7), la gélose BHIT (infusion cœur-cerveau [Brain-Heart], supplémentée avec de la thiamine) (11) et la gélose CSA (au sang de mouton de Colombie). La composition des deux premiers milieux sont les suivantes :

• Gélose PLA

La base de ce milieu sélectif est un mélange de 3 milieux différents à laquelle sont ajoutés les antibiotiques et le jaune d'œuf (30). Des quantités égales (100 ml) et stérile de base pour gélose sélective de *Bacillus cereus* (Oxoid CM617), de gélose trypticase-soja (Merck 5458) et de gélose nutritive supplémentée (SNA pour supplemented nutrient agar) sont fondues avant d'être mélangées. La SNA est composée (pour 1 litre) : gélose nutritive : 23 g ; extrait de levure : 6 g ; extrait de viande : 3 g ; NaCl : 10 g ; Na_2HPO_4 : 2 g ; le pH final est de $7,4 \pm 0,2$. Tous les milieux solides sont stérilisés à 121 °C pendant 15 min. Une solution stock d'acide nalidixique (18) est préparée en mélangeant 0,1 g d'acide nalidixique dans 2 ml de 1 N NaOH et diluée dans 100 ml de tampon phosphate 0,01 M (pH 7,2). Une solution stock d'acide pipémidique (2) est préparée en mélangeant 0,2 g d'acide pipémidique dans 2 ml de 0,1 N NaOH et diluée ensuite dans 100 ml du même tampon phosphate. Les deux solutions d'antibiotiques sont stérilisées par filtration.

Quand les 3 milieux fondus ont été mélangés, 3 ml de la solution stock d'acide nalidixique, 3 ml de la solution stock de l'acide pipémidique et 30 ml d'une suspension à 50 % de jaune d'œufs (13) sont ajoutés pour former le milieu PLA. Le milieu PLA est versé (20 ml) dans des boîtes de Petri et les boîtes sont séchées avant usage (45 °C à 50 °C 15 min avant).

• **Gélose MYPGP**

La gélose MYPGP est composée pour 1 litre : bouillon Mueller-Hinton (Oxoid CM0405) : 10 g ; extrait de levure : 15 g ; K₂PO₄ : 3 g ; glucose : 2 g ; pyruvate de sodium : 1 g et gélose : 20 g (7). Les acides nalidixique et pipémidique sont ajoutés comme ci-dessus.

Si la croissance de *P. larvae* est contrecarrée par l'apparition de champignons, il est conseillé d'ajouter de l'amphotéricine B (Sigma) : 16,8 µg/ml de milieu.

Un écouvillon stérile est utilisé pour étaler l'échantillon à la surface de la gélose. Pour des études quantitatives, il est conseillé d'étaler un volume donné d'échantillon à l'aide d'une anse de platine ou une pipette plutôt que d'utiliser un écouvillon.

Les boîtes sont incubées entre 34 °C et 37 °C pendant 2 à 4 jours dans une atmosphère enrichie à 5-10 % de CO₂, bien que des conditions aérobies fonctionnent également.

e) Identification

i) Aspect des colonies

Les échantillons provenant des larves cliniquement malades seront à l'origine de cultures largement développées après 2 à 4 jours dans les boîtes, obligeant ensuite à un isolement des colonies lors d'une autre culture.

Sur gélose PLA, les colonies de *P. larvae* sont petites, de couleur vert pâle ou jaune (la même couleur que le milieu), avec une surface rugueuse légèrement opaque ; le centre est parfois surélevé.

Sur gélose MYPGP, les colonies sont petites, régulières, en général rugueuses, plates ou surélevées, blanchâtres ou beiges.

Sur la gélose au sang de Colombie, les colonies sont petites, régulières, luisantes, butyreuses et grisâtres.

Des colonies de *Paenibacillus larvae* de couleur orange ou rouge ont été décrites (10, 22).

Il est conseillé de cultiver en parallèle des souches de référence de *P. larvae* comme par exemple la souche LMG 9820 (autre dénomination : ATTC 9545, DSM 7030) pour les variants non pigmentés, et les souches DSM 16115 ou DSM 16116 pour les génotypes pigmentés.

Un échantillon confirmé positif en provenance d'un couvain ou de miel peut être utilisé comme témoin tout au long de l'examen.

L'aspect des colonies ne permet pas de conclure sur l'identité des bactéries mais peut servir au choix des colonies pour les examens complémentaires d'identification.

ii) Réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Les mélanges de la réaction de PCR de 50 µl de tampon PCR approprié contiennent 5 µl de matrice ADN (voir préparation des échantillons), 50 pmol des deux amorces (sens : AFB-F et anti-sens : AFB-R) (les séquences des amorces sont données ci-dessous), 10 nmol de chaque déoxynucléotide triphosphate et 1 à 2,5 U. de *Taq* polymérase (le tampon PCR est fourni avec la *Taq* polymérase et contient 2 mM de MgCl₂ [réf. 9 avec les modifications]). Il est possible de réduire le volume du mélange réactionnel à 25 µl. L'amplification d'un fragment spécifique est réalisée dans un thermocycleur selon les cycles de PCR suivants : une étape à 95 °C (entre 1 et 15 min) ; 30 cycles à 93 °C (1 min), 55 °C (30 s) et 72 °C (1 min) ; puis un cycle final à 72 °C (5 min).

La PCR nichée comprend une étape externe et une étape interne d'amplification (20). L'étape externe d'amplification est réalisée en utilisant des amorces PleF et PleR (voir ci-dessous). Chaque mélange réactionnel de 50 µl contient : 10 µl de matrice ADN (voir préparation des échantillons), 1 × de tampon PCR (avec 1,5 mM de MgCl₂), 0,5 µM d'amorce PleF, 0,5 µM d'amorce PleR, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,75 mM de MgCl₂ supplémentaire, 1,25 U de *Taq* polymérase. Un protocole de PCR « touchdown » a réduit l'étape d'hybridation à 0,5 C/cycle de 69 °C à 59 °C, pour un total de 20 cycles avec une dernière étape d'hybridation de 30 s. 20 cycles supplémentaires sont ensuite réalisés à une température de 59 °C pendant 30 s permettant l'hybridation. Les étapes de dénaturation sont toutes réalisées à 94 °C (pendant 30 s) et d'extension à 72 °C (pendant 45 s). Ensuite, une étape finale d'extension à 72 °C pendant 5 min est effectuée puis la réaction est refroidie à 4 °C. L'amplification interne est réalisée en utilisant les amorces PliF et PliR (voir ci-dessous). Chaque mélange réactionnel de 50 µl contient 1 µl du produit de l'amplification externe, 1 × de tampon PCR (avec 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de l'amorce PliF, 0,5 µM de l'amorce PliR, 0,2 mM de chaque dNTP, 1 mM de MgCl₂ supplémentaire, 1,25 U. de *Taq* polymérase. Les cycles sont les suivants : 94 °C (30 s), 59 °C (30 s), 72 °C (45 s) pour un total de 30 cycles suivis par 5 min à 72 °C, puis la réaction est refroidie à 4 °C.

Les poids moléculaires des produits d'amplification sont déterminés par électrophorèse dans un gel à 0,8 % d'agarose et coloré au bromure d'éthidium.

Réf.	Nom	Séquence	Taille des produits PCR	Niveau de spécificité
(9)	AFB-F	5'-CTT-GTG-TTT-CTT-TCG-GGA-GAC-GCC-A-3'	1106 pb	espèces
	AFB-R	5'-TCT-TAG-AGT-GCC-CAC-CTC-TGC-G-3'		
(20)	PleF	5'-TCG- AGC-GGA-CCT-TGT-GTT-3'	969 pb	espèces
	PleR	5'-CTA-TCT-CAA-AAC-CGG-TCA-GAG-3'		
	PliF	5'-CTT-CGC-ATG-AAG-TCA-TG-3'	572 pb	
	PliR	5'-TCA-GTT-ATA-GGC-CAG-AAA-GC-3'		

iii) Tests biochimiques

Paenibacillus larvae peut aussi être identifié par son profil biochimique. La bactérie est catalase négative ou faiblement positive à retardement, elle a un profil de fermentation des sucres caractéristique : positif avec le glucose et le tréhalose, mais négatif avec l'arabinose et le xylose, et elle peut hydrolyser la caséine ou le lait. Certaines souches de *P. larvae* peuvent avoir des signes biochimiques différents.

- Test de la catalase

Une goutte d'eau oxygénée à 3 % est placée sur une culture en croissance active sur le milieu de culture. La plupart des bactéries aérobies décomposent le peroxyde en eau et en oxygène, produisant une mousse effervescente, mais *P. larvae* est presque toujours négatif pour cette réaction, ou légèrement positif (mais avec retard) (15). Quand la gélose de Colombie au sang de mouton est employée pour la culture, le test ne peut pas être effectué sur ce milieu car la présence du sang de cheval entraînera une réaction faussement positive. Dans ce cas, des colonies devront être transférées sur une lame de microscope propre pour l'exécution du test, et la lecture du test se fait à l'œil nu.

- Fermentation des sucres (13)

Des bactéries sont mises en culture dans du bouillon J (par litre : extrait de levure, 15 g et K₂HPO₄, 3 g) dans lequel 0,5 % de substrat d'essai (stérilisé séparément en solution aqueuse) remplace le glucose. Les sucres utilisés dans le substrat d'essai sont le L (+)-arabinose, le D (+)-glucose, le D (+)-xylose et le D (+)-tréhalose. Les cultures sont examinées au 14^e jour : 1 ml ou moins d'une colonie bactérienne est prélevé aseptiquement, l'échantillon est mélangé avec une goutte de 0,04 % d'alcool de bromocrésol pourpre et on observe la couleur de l'indicateur. *Paenibacillus larvae* produit de l'acide en conditions aérobies à partir du glucose et du tréhalose. Aucun acide n'est produit à partir de l'arabinose et du xylose (1).

L'utilisation de kits de diagnostic disponible dans le commerce, comme API 50 CHB (5), BBL CRYSTAL (8) et Biolog system (22) pour la caractérisation biochimique de *P. larvae* peut être prise en considération.

- Hydrolyse de la caséine (30)

L'hydrolyse de la caséine est vérifiée sur gélose au lait + thiamine (par litre : gélose 20 g, extrait de levure 10 g, stérilisée à 121 °C pendant 15 min.). À 70 ml de milieu refroidi, ajouter 30 ml de lait écrémé UHT et 1,5 ml d'une solution de thiamine à 0,1 % stérilisée par filtration. Les boîtes de Petri sont ensemencées et examinées après 5 jours d'incubation à 36 °C ± 1 °C. *Paenibacillus larvae* hydrolyse la caséine et induit ainsi une réaction positive indiquée par l'éclaircissement du milieu sous et autour de la zone de croissance de la colonie.

iv) Techniques basées sur les anticorps

Différentes techniques basées sur les anticorps ont été développées pour le diagnostic de la loque américaine. La plupart d'entre elles sont effectuées à partir de sérums polyclonaux de lapin développés contre des cultures pures de *P. larvae*. Elles peuvent être utilisées pour l'identification des colonies bactériennes obtenues après une étape de mise en culture ou directement sur des restes de larves suspectes.

Dans une épreuve d'immunodiffusion, les anticorps interagissent avec les antigènes bactériens lors d'un double procédé de diffusion, laissant ainsi des arcs de précipitation (25). Dans la technique des anticorps fluorescents ces anticorps sont conjugués avec un fluorochrome. L'anticorps fluorescent résultant réagit avec un frottis de *P. larvae* sur une lame. L'excès d'antisérum est lavé, l'échantillon est examiné en microscopie à fluorescence. *Paenibacillus larvae* se colore spécifiquement par fluorescence sur fond noir (24, 33, 36). Une méthode immuno-enzymatique (ELISA) employant un anticorps monoclonal spécifique de *P. larvae* existe (23). Un appareil à flot latéral pour un diagnostic rapide de la loque américaine a été commercialisé.

v) Microscopie

Deux techniques de microscopie sont couramment utilisées. La coloration de Gram sur des frottis de bactéries isolées est souvent pratiquée. *Paenibacillus larvae* est Gram positif. La coloration à la fuchsine phéniquée est réalisée sur des frottis de larve et peut confirmer un diagnostic clinique de loque américaine sur la base de l'aspect des spores. Ces techniques sont décrites ci-dessous.

- Coloration de Gram des bactéries

Couvrir complètement la lame avec du violet cristal. Laisser agir le violet cristal pendant 60 s puis laver à l'eau pendant 5 s. L'échantillon doit apparaître coloré en bleu-violet à l'œil nu. Recouvrir la lame avec la solution d'iode pendant 1 min. Rincer la lame à l'eau pendant 5 s (à ce stade, l'échantillon doit toujours être bleu-violet) et continuer immédiatement par application du décolorant, l'éthanol. Cette étape est subjective car en utilisant trop de décolorant il est possible d'obtenir un faux résultat Gram –. De même, une insuffisance de décolorant peut conduire à un faux résultat Gram +. Pour plus de sécurité, ajouter l'éthanol goutte à goutte jusqu'à ce que l'échantillon n'apparaisse plus bleu-violet. Rincer à l'eau pendant 5 s. L'étape finale consiste à appliquer le contre-colorant, la safranine. Recouvrir la lame avec la safranine et laisser agir pendant 1 min. Les bactéries Gram + ne se coloreront pas ou très peu avec la safranine tandis que les bactéries Gram – apparaîtront colorées en rose et seront faciles à distinguer. Rincer à l'eau pendant 5 s pour éliminer l'excès de colorant. Tamponner doucement avec un papier buvard et laisser sécher à l'air avant l'observation au microscope.

- Coloration à la fuchsine phéniquée des frottis de larves (17)

Fixer les frottis par chauffage. Recouvrir les lames avec 0,2 % de fuchsine phéniquée pendant 30 s. Éliminer le colorant par lavage et laisser sécher à l'air ou tamponner délicatement la lame avec du papier absorbant. Examiner au microscope pour observer les spores de *P. larvae* : de forme elliptique avec des bords épais, de $0,6 \times 1,3 \mu\text{m}$.

2. Épreuves sérologiques

Il n'existe pas d'épreuves sérologiques applicables pour le diagnostic.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

- Production d'anticorps

Un laboratoire, le Central Science Laboratory Pocket Diagnostic (Royaume-Uni) a développé un kit de diagnostic VITA pour le dépistage précoce de la loque américaine.

Lors de la mise au point de test de diagnostic avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, il n'y a pas de réactions croisées avec des bactéries apparentées ou des bactéries fréquemment retrouvées dans les ruches, comme par exemple *Paenibacillus alvei*, qui est souvent isolée dans les dernières phases de la loque européenne.

REMERCIEMENTS

Illustrations par Karl Weiss, extrait de Bienen-Pathologie, 1984, elles sont reproduites avec l'aimable permission de l'auteur et de l'Ehrenwirth-Verlag, Munich (Allemagne). Les photographies proviennent du Central Science Laboratory, de York (R-U) et de l'Informatiecentrum voor Bijenteelt, Gand (Belgique), elles sont éditées avec la permission de Ruth Waite et Frans J. Jacobs, respectivement.

Une publication FAO, « Honey bee diseases and pests: a practical guide, W. Ritter & P. Akratanakul (eds). Agricultural and Food Engineering Technical Report No. 4. FAO, Rome, Italy, 42 pp. ISSN 1814-1137 TC/D/A0849/E, est disponible gratuitement à l'adresse internet suivante : http://www.fao.org/WAICENT/faoINFO/AGRICULT/ags/subjects/en/industFoodAg/pdf/AGST_techrep_4.pdf

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALIPPI A.M. (1992). Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American foulbrood of honey-bees. First record of its occurrence in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.*, **24**, 67–72.
2. ALIPPI A.M. (1995). Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiologica SEM*, **11**, 343–350.
3. BAKONYI T., DERAKHSHIFAR I, GRABENSTEINER E. & NOWOTNY N. (2003). Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (3), 1504–1510.
4. BRØDSGAARD C.J., HANSEN H. & RITTER W. (2000). Progress of *Paenibacillus larvae larvae* infection in individually inoculated honey bee larvae reared single *in vitro*, in micro colonies, or in full-size colonies. *J. Apicult. Res.*, **39** (1–2), 19–27.
5. CARPANA E., MAROCCHI L. & GELMINI L. (1995). Evaluation of the API 50CHB system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*. *Apidologie*, **26**, 11–16.
6. DE GRAAF D.C., VANDEKERCHOVE D., DOBBELAERE W., PEETERS J.E. & JACOBS F.J. (2001). Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey. *Apidologie*, **32**, 587–599.
7. DINGMANN D.W. & STAHLY D.P. (1983). Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**(4), 860–869.
8. DOBBELAERE W., DE GRAAF D.C., PEETERS J.E & JACOBS F.J. (2001). Comparison of two commercial kits for the biochemical characterization of *Paenibacillus larvae larvae* in the diagnosis of AFB. *J. Apic. Res.*, **40**, 37–40.
9. DOBBELAERE W., DE GRAAF D.C., PEETERS J.E & JACOBS F.J. (2001). Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie*, **32**, 363–370.
10. GENERSCH E., ASHIRALIEVA A. & FRIES I. (2005). Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honey bees. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, (in press).
11. GOCHNAUER T.A. (1973). Growth, protease formation, and sporulation of *Bacillus larvae* in aerated broth culture. *J. Invertebr. Pathol.*, **22**, 251–257.
12. GOCHNAUER T.A. & CORNER J. (1987). Detection and identification of *Bacillus larvae* in a commercial pollen sample. *J. Apic. Res.*, **13**, 264–267.
13. GORDON R.E., HAYNES W.C. & PANG C.H.N. (1973). The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook N° 427, USDA, Washington D.C.
14. HANSEN H. & BRØDSGAARD C.J. (1999). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*, **80** (1), 5–23.
15. HAYNES W.C. (1972). The catalase test. An aid in the identification of *Bacillus larvae*. *Am. Bee J.*, **112**, 130–131.
16. HEYNDRIKX M., VANDEMEULEBROECKE K., HOSTE B., JANSSEN P., KERSTERS K., DE VOS P., LOGAN N.A., ALI N. & BERKELEY R.C. (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 270–279.
17. HORNITZKY M.A.Z. & WILSON S.C. (1989). A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honeybees. *J. Apicult. Res.*, **28**, 191–195.

18. HORNITZKY M.A.Z. & CLARK S. (1991). Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. *J. Apic. Res.*, **30** (1), 13–16.
19. KOSTECKI R. (1969). Studies on improvement of control of American foulbrood of the honey bee (in Polish). *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, **13**, 97–135.
20. LAURO F.M., FAVARETTO M., COVOLO L., RASSU M. & BERTOLONI G. (2003). Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *Int. J. Food Microbiol.*, **81**, 195–201.
21. LINDSTRÖM A. & FRIES I. (2005). Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) spores in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J. Apicult. Res.*, **44** (2), 82–86.
22. NEUENDORF S., HEDTKE K., TANGEN G. & GENERSCH E. (2004). Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology SGM*, **150**, 2381–2390.
23. OLSEN P.E., GRANT G.A., NELSON D.L. & RICE W.A. (1990). Detection of American foulbrood disease of the honeybee, using a monoclonal antibody specific to *Bacillus larvae* in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Microbiol.*, **36**, 732–735.
24. OTTE E. (1973). Contribution to the laboratory diagnosis of American foulbrood of the honey bee with particular reference to the fluorescent antibody technique. *Apidologie*, **4** (4), 331–339.
25. PENG Y.S. & PENG K.Y. (1979). A study on the possible utilization of immunodiffusion and immunofluorescence techniques as diagnostic methods for American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.*, **33**, 284–289.
26. PICCINI C., D'ALESSANDRO B., ANTUNEZ K. & ZUNINO P. (2002). Detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 761–765.
27. RITTER W & KIEFER M.B. (1995). A method for diagnosing *Bacillus larvae* in honey samples. *Animal Res. Develop.*, **42**, 7–13.
28. RITTER W. (2003). Early detection of American foulbrood by honey and wax analysis. *Apiacta*, **38**, 125–130.
29. RUDENKO E.V. (1987). Manuscript. Dissertation for Doctorate of Veterinary Science American foulbrood of honey bees and its vaccine prophylaxis (in Russian), Minsk, Belarus.
30. SCHUCH D.M.T., MADDEN R.H. & SATTLER A. (2001). An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey. *J. Apicult. Res.*, **40** (2), 59–64.
31. SHIMANUKI H. & KNOX D.A. (1988). Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. *Am. Bee J.*, **128**, 353–354.
32. TITERA D & HAKLOVA M. (2003). Detection method of *Paenibacillus larvae larvae* from beehive winter debris. *Apiacta*, **38**, 131–133.
33. TOSHKOV A., VALARIANOV T. & TOMOV A. (1970). The immunofluorescence method and the quick and specific diagnosis of American foulbrood of bee brood (in German). *Bull. Apic.*, **13**, 13–18.
34. VON DER OHE W. & DUSTMANN J.H. (1997). Efficient prophylactic measures against American foulbrood by bacteriological analysis of honey for spore contamination. *Am. Bee J.*, **137** (8), 603–606.
35. WOODROW A.W. (1941). Susceptibility of honey bee larvae to American foulbrood. *Gleanings Bee Cult.*, **69**, 148–151.
36. ZHAVNENKO V.M. (1971). Indirect method of immunofluorescence in the diagnosis of foulbrood (American and European) (in Russian). *Veterinariia*, **8**, 109–111.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour les maladies des abeilles (se reporter à la liste dans la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour la liste la plus récente : www.oie.int).

LOQUE EUROPÉENNE DES ABEILLES MELLIFÈRES

RÉSUMÉ

*L'agent causal de la loque européenne des abeilles mellifères est la bactérie *Melissococcus plutonius*. Son identification par l'observation des signes cliniques sur le terrain est incertaine. Le signe le plus courant et évident est la mort des larves peu avant l'operculation des cellules, mais ce signe n'est pas spécifique de la loque européenne. La plupart des colonies infectées montrent peu de signes évidents, ceux-ci diminuent rapidement et spontanément avant la fin de chaque période d'activité des abeilles. L'infection demeure enzootique chez différentes colonies en raison de la contamination mécanique des cadres de couvain par les formes résistantes. La maladie peut donc ré-émerger les années suivantes.*

Identification de l'agent pathogène : *l'observation, par microscopie, de nombreux cocci lancéolés présents dans les préparations de larves est efficace dans la plupart des cas, particulièrement lorsqu'elle est effectuée par des personnes expérimentées.*

Les moyens classiques d'établir un diagnostic de la loque européenne sont l'isolement et l'identification de l'agent causal. Celui-ci peut être facilement différencié des autres bactéries rencontrées chez l'abeille par des mises en cultures.

La bactérie isolée peut être identifiée et différenciée par un simple test d'agglutination en tube. Une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) et une PCR semi-nichée peuvent être aussi utilisées. La seconde permet une analyse directe des larves, des abeilles adultes, du miel et des autres produits de la ruche.

Épreuves sérologiques : *il n'existe pas d'épreuve sérologique applicable pour le diagnostic.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *il n'y a aucun vaccin ni aucun produit biologique de disponible.*

A. INTRODUCTION

Habituellement, les larves d'abeilles atteintes de loque européenne meurent 1 ou 2 jours avant l'operculation des cellules, parfois juste après, mais toujours avant la métamorphose en chrysalide. La maladie est causée par *Melissococcus plutonius* et se produit généralement lors d'une période où les colonies se développent rapidement. La plupart des larves malades perdent leurs positions enroulées en fond de cellule avant de mourir. La majorité d'entre-elles sont rapidement détectées et enlevées par les abeilles nourricières, laissant des cellules vides dispersées aléatoirement sur le cadre de couvain. Certaines larves infectées survivent, arrivent avec succès à la pupaison et émergent en tant qu'adultes. Les fèces de ces larves survivantes sont infectées et contribuent à propager la maladie (2).

Les larves infectées échappant aux contrôles des abeilles adultes meurent, puis deviennent flasques et prennent une couleur jaune-clair qui vire rapidement au brun, dans le même temps celles-ci se dissolvent en une masse semi-liquide. Elles se dessèchent alors pour former une écaille de couleur brun foncé facilement détachable des cellules. La plupart du temps, le couvain sévèrement atteint peut avoir une odeur aigre ou de moisie, parfois acide, comme le vinaigre, mais souvent il n'y a aucune odeur.

Habituellement, les signes de la maladie disparaissent spontanément des colonies infectées avant la fin de la saison d'activité, mais sont susceptibles de réapparaître les années suivantes (4, 10).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

a) Microscopie

Les larves fraîchement mortes sont les meilleures pour le diagnostic. Avant que la décomposition ne survienne, les larves malades peuvent être écrasées sur une lame de microscope. La cuticule peut-être écartée avec des pinces. Le contenu de la larve est étalé et déposé sur la lame, avec la membrane externe gélatineuse et transparente. Celle-ci est partiellement ou presque totalement remplie de bactéries, facilement observables sous forme d'amas opaques blancs. Le contenu des viscères des larves saines, qui sont moins faciles à disséquer, a une couleur brun doré. Les larves apparemment saines peuvent contenir un mélange de bactéries et de pollen. Les viscères des larves saines contenant beaucoup de pollen de couleur claire peuvent ressembler à celles remplies de bactéries.

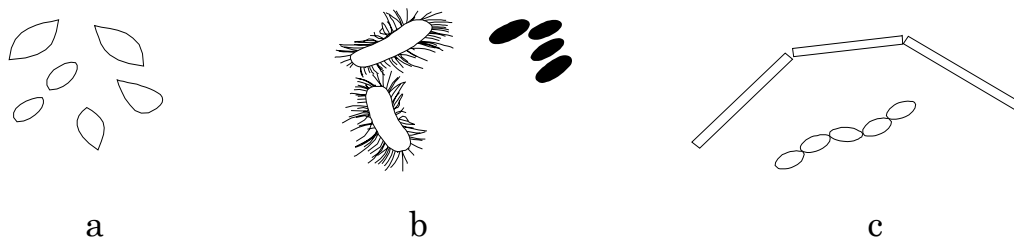


Fig. 1. Bactéries associées à la loque européenne.

(a) *Melissococcus plutonius* : l'agent causal de loque européenne se présente seul, en chaînes longitudinales ou en agglomérats. Il ressemble morphologiquement à *Enterococcus faecalis*, un envahisseur secondaire banal.

(b) *Paenibacillus alvei* : formes végétatives $2,0-7,0 \times 0,8-1,2 \mu\text{m}$ avec des flagelles ; sporulation en spores contiguës. Les bâtonnets et les spores sont plus grands que ceux de *Paenibacillus larvae* (voir loque américaine).

(c) *Bacterium eurydice* : effilés, disposition indéfinie des bâtonnets in vivo mais peuvent former des chaînes de coques in vitro dans certains milieux.

Pour une recherche bactériologique, une oese d'une suspension aqueuse diluée d'extrait larvaire est déposée sur une lame propre de microscope et est mélangée à une oese de 5 % de nigrosin aqueux. L'ensemble est réparti sur 1 ou 2 cm² de lame, séché doucement au-dessus d'une flamme, et examiné directement au microscope à fort grossissement. La présence de nombreux coques lancéolés, d'une taille d'environ $0,5 \times 1,0 \mu\text{m}$, trouvés seuls ou en amas, et disposés bout à bout par paires ou en courtes chaînes, est presque toujours observée en cas de loque européenne. Quelques bâtonnets très effilés avec une disposition indéfinie ressemblant à des bactéries sont également présents (Figure 1). Les coques sont Gram-positifs et les bacilles sont Gram-négatifs. Des préparations semblables faites à partir de suspensions aqueuses de larves toutes mortes ou en décomposition sont susceptibles de présenter un amas important de bactéries parmi lesquelles il sera difficile de distinguer *M. plutonius*.

b) Méthodes de culture

Melissococcus plutonius (souche-type NCIMB 702443) est la bactérie la plus abondante durant les premières phases d'infection (5, 6). *Melissococcus plutonius* peut être cultivé sur milieu (exprimé en g/litre ou ml/litre) contenant : extrait de levure ou certaines peptones, 10 (5) ; cystéine ou cystine, 0,2 à 2,0 ; glucose ou fructose, 10 ; amidon soluble, 10 ; KH_2PO_4 à 1 M, 100 à pH 6,6 ; et agar, 2. Le milieu est de préférence stérilisé à l'autoclave par lots de 100 ml dans des bouteilles avec un couvercle vissé à 116 °C pendant 20 min et versé dans des boîtes de Petri juste avant l'utilisation. Ces boîtes sont inoculées avec les suspensions aqueuses diluées des larves malades, ou mieux, par des extraits de larves malades. Ces derniers peuvent être préparés à l'avance pour permettre de sécher sur la lame, ils peuvent alors être gardés, pendant des années à 4 °C ou à -20 °C, si nécessaire. Tous les milieux de culture doivent être soumis au contrôle de qualité et doivent assurer la croissance de petits inoculums de *M. plutonius*. La souche de référence doit également être cultivée parallèlement aux échantillons suspects pour s'assurer que les tests fonctionnent correctement.

La préparation et le stockage des frottis séchés éliminent également la plupart des organismes secondaires après quelques semaines sans affecter la viabilité de *M. plutonius*. Cet organisme est isolé le plus efficacement par des dilutions décimales d'inoculum de la suspension aqueuse dans de l'agar fondu et maintenu à 45 °C, celui-ci est alors versé dans les boîtes. Les boîtes doivent être incubées en anaérobiose, comme c'est le cas des fioles de McIntosh et de Fildes dans une atmosphère contenant environ 5 à 10 % de dioxyde de carbone (CO_2) à 35 °C. Les petites colonies blanchâtres de *M. plutonius* apparaissent

généralement dans les 4 jours. Cette bactérie est quelque peu pléomorphique *in vitro*, apparaissant souvent sous forme de bâtonnets. Le pH final du milieu peut atteindre 5,5. Avec le temps, les souches qui cultivent le plus rapidement sont sélectionnées. Des milieux simplifiés ou modifiés peuvent alors assurer la multiplication, notamment celle du groupe *M. plutonius* en provenance du Brésil ayant des caractéristiques sérologiques propres (1) et qui se multiplie sur des milieux chimiquement définis (3). Le CO₂ reste essentiel. Des bouillons inoculés doivent être fermés quand la croissance bactérienne est évidente. Ils peuvent alors être maintenus à 4 °C pendant 6 mois. Autrement, les cultures peuvent être réalisées dans un milieu contenant 10 % de sucrose, 5 % d'extrait de levure, KH₂PO₄ à 0,1 M, et à pH 6,6, puis elles doivent être lyophilisées.

Un certain nombre de bactéries sont souvent associées et confondues avec *M. plutonius*. *Bacterium eurydice* se retrouve dans l'appareil digestif des abeilles adultes et se reproduit généralement en petit nombre dans l'intestin des larves saines. Il est en plus grand nombre dans les larves atteintes de *M. plutonius*. L'incidence de *Bacterium eurydice* sur les abeilles saines est très limitée en hiver et au début du printemps, mais augmente en été. Elle forme des bâtonnets aplatis aux extrémités qui se multiplient de manière isolée ou en chaînes. Une fois cultivée dans certains milieux, elle ressemble parfois à des streptocoques et peut être confondue avec *M. plutonius*. Cependant, ses caractéristiques de culture ressemblent étroitement à celles de *Corynebacterium pyogenes* (10), sous sa forme en bâtonnet, les conditions requises pour la culture de *M. plutonius*, ne lui sont pas favorables.

Enterococcus (= *Streptococcus*) *faecalis* ressemble morphologiquement à *M. plutonius* et a souvent été confondu avec lui, bien qu'on puisse facilement les différencier par leurs conditions de culture. À la différence de *M. plutonius*, il ne reste pas viable longtemps une fois sec et n'entraîne pas de contamination mécanique chez des colonies d'abeille. Il est probablement introduit dans la ruche par le butinage des abeilles adultes, et est responsable de l'odeur aigre parfois produite avec la loque européenne.

Enterococcus faecalis cultive bien *in vitro* dans les mêmes conditions que *M. plutonius*, mais il peut être facilement différencié grâce à sa capacité de multiplication en conditions aérobies. Il forme en 24 h de petites colonies transparentes et est anaérobie facultatif. Il se multiplie sur un grand nombre de milieux usuels avec ou sans hydrates de carbone ou CO₂. Le pH final en présence de glucose est 4. *Enterococcus faecalis* excède rarement le nombre de *M. plutonius* dans une larve d'abeille, et est habituellement dilué dans la masse. Quand il n'est pas dilué il produit suffisamment d'acide pour empêcher la multiplication *in vitro* de *M. plutonius*.

Enterococcus faecalis ne se multiplie pas dans les larves d'abeille en l'absence de *M. plutonius*, ainsi sa présence en grands nombres peut-elle être un indicateur de loque européenne.

Paenibacillus alvei (= *Bacillus*) est généralement plus fréquent que *E. faecalis* dans des colonies d'abeille affectées par la loque européenne, mais n'étant pas toujours associé à la maladie il ne peut servir d'indicateur fiable. Dans des colonies d'abeille, il se multiplie seulement dans les larves en décomposition, ensuite ces spores prédominent souvent largement celles des autres bactéries, même si celles-ci demeurent inapparentes au départ. *Paenibacillus alvei* produit des spores très résistantes qui persistent dans les colonies d'abeilles avec la loque européenne enzootique. Il est responsable d'une odeur de moisi caractéristique. *Paenibacillus alvei* se multiplie mal *in vitro* dans les conditions favorables à *M. plutonius*. Lors de sa croissance, il produit des colonies diffuses et transparentes, dont certaines sont mobiles et se propagent en arcs de cercle à la surface de la gélose. Les cultures ont une odeur de moisi caractéristique qui est associée à la loque européenne quand le bacille est présent. Des spores sont rapidement formées.

c) Méthodes immunologiques

Pour l'identification de *M. plutonius*, l'antisérum peut être préparé chez les lapins avec des cultures purifiées de *M. plutonius* par les injections intraveineuses (7) ou par une injection intramusculaire simple de 1 ml de suspension d'antigène mélangé à un volume égal de l'adjuvant incomplet de Freund.

Des analyses sont faites par des tests d'agglutination dans des tubes contenant des suspensions bactériennes équivalentes à 0,25 mg de poids sec par ml. Les limites sont notées après que des tubes aient été incubés pendant 4 h à 37 °C.

Un kit pour la recherche d'anticorps dirigés contre *M. plutonius* a récemment été mis au point et est disponible dans le commerce. Il donne rapidement une confirmation du diagnostic sur le site même à partir des larves.

d) Réaction d'amplification en chaîne par polymérase

La technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) peut être appliquée à des colonies bactériennes suspectes transférées dans des milieux liquides pour être multipliées (9). L'ADN est préparé

selon les méthodes classiques (12). Le culot d'ADN est remis en suspension dans 50 µl de tampon TE × 1 (10 mM de Tris/HCl, pH 7,5 ; 1 mM d'EDTA [acide éthylène diamine tétra-acétique]). Environ 1 à 3 µg d'ADN sont amplifiés sous un volume de 50 µl. La réaction de PCR peut aussi être réalisée sur des larves. Chaque larve est incubée séparément dans un milieu liquide à 30 °C pendant 1 nuit dans une fiole anaérobie contenant de l'hydrogène et 10 % de CO₂. Deux millilitres de chaque échantillon sont alors centrifugés à 1 000 *g* pendant 2 min, et le surnageant est centrifugé à 10 000 *g* pendant 5 min. Le culot est remis en suspension dans 100 µl d'H₂O stérile et chauffé à 95 °C pendant 15 min. Un microlitre (1 µl) est amplifié dans 50 µl de mélange réactionnel pour PCR. En plus de la matrice ADN, ce mélange contient aussi 2 mM MgCl₂, 50 pmol d'amorce sens (EFB-F) et anti-sens (EFB-R ; les séquences des amorces sont données ci-dessous) par ml, 25 mM (chacun) de désoxynucléoside triphosphate et 1 U de polymérase *Taq*. L'amplification d'un fragment spécifique d'ADN est réalisée dans un thermocycleur dans les conditions suivantes : une étape à 95 °C (1 min) ; 30 cycles à 93 °C (1 min), à 55 °C (30 s) et 72 °C (1 min) ; et un cycle final à 72 °C (5 min).

Une PCR semi-nichée a d'abord été mise au point par Djordjevic *et al.* (8) puis améliorée pour une détection plus sensible de *M. plutonius* dans le miel, le pollen, les larves et les abeilles adultes (11). Le mélange de la réaction de 50 µl comprend 5 à 30 ng d'ADN génomique, 3 mM de MgCl₂, 200 µM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate, 100 ng des amorces MP1 et MP2, 5 µl de tampon pour PCR × 10 (100 mM de Tris/HCl, pH 8,3 ; 15 mM de MgCl₂, 500 mM de KCl) et 1 U de polymérase *Taq*. Les conditions de l'amplification sont les suivantes : un cycle initial de dénaturation à 95 °C pendant 2 min. suivi par 40 cycles de dénaturation (95 °C, 30 s), hybridation des amorces (61 °C, 15 s), élongation des amorces (72 °C, 1 min), eux-mêmes suivis par une étape supplémentaire d'élongation de 5 min à 72 °C. La 3^e amorce MP3 est utilisée conjointement avec MP1 pour amplifier un fragment d'ADN à partir de 1 µl du produit de la PCR primaire obtenu au cours de la réaction précédente. Les conditions de la PCR semi-nichée sont les mêmes que celles décrites ci-dessus à l'exception de la concentration de MgCl₂ qui est abaissée à 1,5 mM et de la température d'hybridation qui est abaissée à 56 °C.

Les poids moléculaires des produits de PCR sont déterminés par électrophorèse sur gel entre 1 % et 1,5 % d'agarose et la coloration est réalisée au bromure d'éthidium.

Ref.	Nom	Séquence	Taille du produit de PCR
(9)	EFB-F EFB-R	5'-GAA-GAG-GAG-TTA-AAA-GGC-GC-3' 5'-TTA-TCT-CTA-AGG-CGT-TCA-AAG-G-3'	812 pb
(8, 11)	MP1 MP2 MP3	5'-CTT-TGA-ACG-CCT-TAG-AGA-3' 5'-ATC-ATC-TGT-CCC-ACC-TTA-3' 5'-TTA-ACC-TCG-CGG-TCT-TGC-GTC-TCT-C-3'	486 pb 276 pb

2. Épreuves sérologiques

Il n'existe pas d'épreuve sérologique applicable pour le diagnostic.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Aucun vaccin ni produit biologique pour le diagnostic n'est disponible.

REMERCIEMENTS

Illustrations par Karl Weiss, extrait de *Bienen-Pathologie*, 1984. Reproduit avec la permission de l'auteur et de l'*Ehrenwirth-Verlag*, Munich (Allemagne).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALLEN M.F. & BALL B.V. (1993). The cultural characteristics and serological relationships of isolates of *Melissococcus pluton*. *J. Apic. Res.*, **32**, 80–88.

2. BAILEY L. (1960). The epizootiology of European foulbrood of the larval honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *J. Insect Pathol.*, **2**, 67–83.
3. BAILEY L. (1984). A strain of *Melissococcus pluton* cultivable on chemically defined media. *FEMS Microbiol. Lett.*, **25**, 139–141.
4. BAILEY L. & BALL B.V. (1991). Honey Bee Pathology. Academic Press, London, UK, and New York, USA.
5. BAILEY L. & COLLINS M.D. (1982). Taxonomic studies on *Streptococcus pluton*. *J. Appl. Bacteriol.*, **53**, 209–213.
6. BAILEY L. & COLLINS M.D. (1982). Reclassification of *Streptococcus pluton* (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; Comb. nov. *J. Appl. Bacteriol.*, **53**, 215–217.
7. BAILEY L. & GIBBS A.J. (1962). Cultural characters of *Streptococcus pluton* and its differentiation from associated enterococci. *J. Gen. Microbiol.*, **28**, 385–391.
8. DJORDJEVIC S.P., NOONE K., SMITH L. & HORNITZKY M.A.Z. (1998). Development of a semi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. *J. Apic. Res.*, **37**, 165–174.
9. GOVAN V.A., BROZEL V., ALLSOPP M.H. & DAVISON S. (1998). A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1983–1985.
10. JONES D. (1975). A numerical taxonomic study of Coryneform and related bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **87**, 52–96.
11. MCKEE B.A., DJORDJEVIC S.P., GOODMAN R.D. & HORNITZKY M.A. (2003). The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. *Apidologie*, **34**, 19–27.
12. WILSON K. (1990). Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Smith J.A., Seidman J.G. & Struhl K., eds. Greene Publishing Association and Wiley Interscience, New York, USA, 241–245.

*

* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour les maladies des abeilles (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

NOSÉMOSE DES ABEILLES MELLIFÈRES

RÉSUMÉ

À l'heure actuelle deux parasites du genre *microsporidium* ont été décrits chez les abeilles : *Nosema apis* (Zander) et *Nosema ceranae* (Fries). *Nosema apis* est un parasite de l'abeille européenne (*Apis mellifera*) et *Nosema ceranae* de l'abeille d'Asie (*Apis cerana*) (11) et des abeilles européennes. *Nosema ceranae* a été récemment détectée chez des populations d'abeilles européennes dans des régions séparées d'Europe (12), d'Amérique du nord et du sud (14) et d'Asie (13). Les conséquences pathologiques de l'infection d'*Apis mellifera* par *Nosema ceranae* ne sont pas bien connues. Le chapitre suivant ne traite que de *Nosema apis*. Les deux espèces sont vraisemblablement semblables. *Nosema apis* est un parasite qui envahit les cellules épithéliales du ventricule des abeilles adultes. Les infections sont transmises, pendant l'alimentation ou le nettoyage, par l'échange de spores. La maladie est présente partout dans le monde, mais le traitement des abeilles peut aider à empêcher la propagation de l'infection vers des colonies d'abeilles encore saines.

Le parasite envahit la région postérieure du ventricule, produisant un grand nombre de spores sur une courte période. Le parasite est ubiquiste. Le nombre de parasites augmente quand les abeilles sont confinées comme en automne ou en hiver dans les climats plus froids quand le couvain diminue et peut-être au début du printemps lorsque le couvain augmente. La maladie est transmise aux abeilles par l'intermédiaire du matériel apicole, de l'eau contaminée, et par trophallaxie ; les stocks de miel et les abeilles écrasées infectées peuvent également jouer un rôle dans la transmission de la maladie. Les spores sont expulsées avec les fèces et peuvent garder leur viabilité pendant plus de 1 an. Les spores peuvent rester contagieuses dans le miel et dans les cadavres d'abeilles infectées ; cependant elles meurent après 3 jours d'immersion dans le miel à la température de la ruche. L'importance relative des fèces, du miel et des cadavres comme réservoirs de spores contagieuses n'est pas entièrement comprise. Cependant, il semble probable qu'une contamination fécale de la cire, particulièrement sur les cadres de couvain, ou d'autres surfaces intérieures de la ruche, fournisse suffisamment d'inoculum pour que *N. apis* se transmette avec succès aux générations suivantes. Les spores sont inactivées par l'acide acétique ou par chauffage à 60 °C pendant 15 min. Pour être efficace, ces traitements doivent être combinés avec l'ajout de l'antibiotique (fumagilline) dans l'alimentation des colonies pour supprimer l'infection dans la ruche. L'Union Européenne interdit l'usage de fumigations antibiotiques (EU 3/01/081).

Identification de l'agent pathogène : dans quelques cas aigus, des marques fécales brunes sont observées sur les cadres et la façade de la ruche, avec des abeilles malades ou mortes à proximité de la ruche. Cependant, la majorité des colonies infectées ne montrent aucun signe évident d'infection, même lorsque la maladie est suffisante pour causer des pertes significatives dans la production de miel et l'efficacité de pollinisation. Pendant l'hiver, il peut y avoir une augmentation de la mortalité des abeilles. Chez les abeilles affectées, le ventricule, qui est normalement brun, peut être blanc et fragile. L'observation au microscope (grossissement : $\times 400$) des broyats abdominaux d'abeilles affectées indiquera la présence de spores ovales de *Nosema apis*, approximativement d'une taille de $5-7 \times 3-4 \mu\text{m}$ avec un bord foncé (*Nosema ceranae* est légèrement plus petit). Leur contenu interne peut être distingué après coloration au colorant de Giemsa, les spores de *Nosema apis* ont un aspect distinct, avec une paroi épaisse non colorée et un intérieur coloré en bleu sans caractéristique particulière. Les noyaux dans les spores ne sont pas visibles. Cette méthode peut aider à distinguer *N. apis* d'autres microorganismes trouvés chez les abeilles.

Les spores de *Nosema apis* peuvent être confondues avec des cellules de levure, des spores de champignons, de gros corps calcifiés ou des kystes de *Malpighamoeba mellificae*. Ces derniers ont

une taille semblable aux spores de *Nosema*, de 6 à 7 µm de diamètre, mais sont de forme sphérique au lieu d'ovale.

Des identifications sûres ne peuvent être faites que par l'observation des spores dans le ventricule ou les fèces. Les infections très bénignes peuvent ne pas être détectables. Le taux d'infection est déterminé par comptage des spores au microscope à l'aide d'une grille. Le calcul du nombre moyen de spores par secteur permet d'estimer le nombre de spores par abeille.

Épreuves sérologiques : il n'existe pas d'épreuve sérologique applicable pour le diagnostic.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : aucun vaccin ni aucun produit biologique pour le diagnostic n'est disponible.

A. INTRODUCTION

Le microsporidium *Nosema apis* (Zander) est un protozoaire parasite exclusif des cellules épithéliales du ventricule des abeilles adultes et la maladie est présente dans le monde entier (16). L'infection se propage grâce aux spores contenues dans l'alimentation (5, 19), lors des trophallaxies (19) ou peut-être lors du nettoyage des poils du corps (6, 10, 19).

Le filament polaire de la spore est extrudé et pénètre l'épithélium de l'intestin, en particulier dans la région postérieure du ventricule. Le contenu de la spore passe par le filament et entre dans le cytoplasme des cellules épithéliales où il se reproduit. L'auto-infection peut se produire en même temps que de nouvelles infections. Après un court intervalle, les spores se développent en grande quantité. Le parasite est ubiquiste et se multiplie à taux constant toute l'année. Le nombre de parasites augmente généralement quand les abeilles sont confinées comme en automne ou en hiver dans les climats plus froids quand le couvain diminue et peut-être au début du printemps lorsque le couvain augmente (19, 20). En hiver, les spores sont rarement observées, ou seulement chez les abeilles fortement infectées.

La défense naturelle inhérente d'une colonie d'abeille contre une forte infection du parasite dépend de la taille de la colonie et des conditions climatiques du début d'automne de l'année précédente (18). Si ces conditions sont défavorables, l'espérance de vie globale de la colonie est réduite. Ceci peut mener à la mort prématurée des abeilles pendant l'hiver ou au début du printemps. Dans le cas précis de colonies épuisées par une infection de *Nosema*, on peut observer la reine entourée de quelques ouvrières, s'occupant confusément d'un couvain déjà operculé.

Les spores peuvent rester viables pendant plus de 1 an dans les fèces (3), jusqu'à 4 mois immergées dans le miel (21) et pendant 4 à 5 ans dans les cadavres d'abeilles infectées (18). Cependant, les spores peuvent perdre leur viabilité après seulement 3 jours immergées dans le miel à la température de ruche (17). Il est probable que la contamination par les fèces de la cire, particulièrement dans les cadres de couvain, ou sur d'autres surfaces internes de la ruche, fournisse suffisamment d'inoculum de *N. apis* pour assurer la contamination des générations suivantes d'abeilles. L'importance relative des fèces, du miel et des cadavres comme réservoirs de spores contagieuses n'est pas totalement comprise et il semble que la température peut avoir un effet important sur la perte de viabilité des spores, indépendamment de leur milieu (17).

Les spores peuvent être détruites en chauffant l'équipement ou les outils apicoles à une température d'au moins 60 °C pendant 15 min. Les cadres peuvent être stérilisés par chauffage à 49 °C pendant 24 h (8). Les vapeurs d'une solution d'au moins 60 % d'acide acétique inactiveront toutes les spores en quelques heures, selon la concentration ; des concentrations plus élevées sont bien plus efficaces et tueront les spores en quelques minutes seulement (2, 9). De telles procédures relèvent de la juridiction des autorités nationales en présence avec des protocoles variant d'un pays à l'autre. La désinfection peut être effectuée, par exemple, en mettant la solution d'acide acétique dans des coupelles disposées sur des éponges qui peuvent absorber le liquide. Après la désinfection qui suit une épizootie, tous les cadres doivent être aérés pendant au moins 14 jours avant utilisation. L'élimination de la nosérose peut aussi être réalisée par un antibiotique, la fumagilline ajouté dans un sirop sucré donné à la colonie (8). Cette procédure est interdite dans l'Union Européenne.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Dans les formes aiguës d'infection, particulièrement en début de printemps, des souillures fécales brunes peuvent être observées sur les cadres et la façade de la ruche (4). À l'entrée de la ruche, des abeilles malades et mortes peuvent être présentes, bien que d'autres causes soient possibles, telles que l'empoisonnement par des

pesticides ou des maladies des abeilles adultes (par exemple l'acarapidose qui doit d'abord être éliminée si elle est présente). La détection de ces maladies requiert un examen au microscope. Pendant l'hiver, les colonies infectées par *Nosema apis* peuvent s'affaiblir fortement ou s'éteindre tout à fait. La majorité des colonies infectées par *Nosema apis* semble normale, sans signe évident de maladie même lorsque celle-ci est suffisante pour causer des pertes importantes dans la production de miel et dans l'efficacité de la pollinisation (1, 11). Un diagnostic approprié peut être fait seulement par l'observation en microscopie du ventricule ou de l'abdomen d'abeille adulte. Pour diagnostiquer une infection par *Nosema apis*, la paire postérieure de segments abdominaux est enlevée avec une pince pour visualiser le ventricule, pourvu des tubules de Malpighi, du petit intestin et du rectum. Le ventricule est normalement brun mais, après une infection par *Nosema*, il peut devenir blanc et fragile. Cependant, cet aspect peut être causé par d'autres perturbations intestinales, par exemple une alimentation par des nourritures commerciales non digestibles, tels que des sirops contenant de la levure active. Pour un diagnostic fiable, un certain nombre d'abeilles devraient être examinées.

a) Microscopie

Il est nécessaire de faire la distinction d'une infection par *Nosema apis* avec une infection provoquée par *Malpighamoeba mellificae* (19). Que se soit pour une infection avec *Nosema apis* ou avec *M. mellificae* des traces de dysenterie sont souvent observées. Cependant, pour *M. mellificae*, ces diarrhées ont souvent une couleur jaune soufre avec une odeur distincte. De plus, des kystes caractéristiques de *M. mellificae* sont observés plus tard. Les infections secondaires mixtes peuvent se produire (17). Une méthode simple non quantitative pour détecter l'infection de *Nosema apis* est la suivante : des abeilles d'au moins 8 jours sont prélevées sur le pas de vol, ceci élimine les faux négatifs obtenues avec des jeunes abeilles où les spores du protozoaire ne se seraient pas encore développées. Un minimum de 60 abeilles est nécessaire afin de détecter 5 % d'abeilles malades avec un indice de confiance de 95 % (10). Avant l'envoi au laboratoire, les abeilles devront être conservées dans du formol à 4 %, de l'alcool éthylique à 70 % ou congelé de manière conventionnelle afin d'empêcher leur décomposition et ainsi d'améliorer leur réception et leur traitement au sein du laboratoire. Les abdomens des abeilles à examiner sont séparés et broyés dans 2 ou 3 ml d'eau. Trois gouttes du broyat sont placées entre lame et lamelle et observées en microscopie au grossissement $\times 400$, sous champ lumineux ou en contraste de phase. C'est une légère simplification de la méthode originale de Cantwell (7). Les spores font environ 5 à 7 μm de long sur 3 à 4 μm de large (*Nosema ceranae* est légèrement plus petite que *Nosema apis*). Elles sont parfaitement ovales avec un contour foncé. Leur contenu, noyau, sporoplasme et filament polaire, ne peuvent pas être observés. Les colorants ne sont habituellement pas nécessaires.

Les spores de *Nosema* doivent être différenciées des cellules de levure, des spores de champignon, des gouttelettes lipidiques et des kystes de *M. mellificae*, qui sont sphériques et approximativement de 6 à 7 μm de diamètre.

Une fois séchées à l'air, les frottis de tissu infecté fixé à l'éthanol sont colorés avec le colorant de Giemsa (à 10 % dans un tampon phosphate à 0,02 M) pendant 45 min. Les spores de *Nosema apis* auront un aspect remarquable, une paroi épaisse non colorée et un intérieur non différencié bleu, sans noyau apparent. Les cellules d'insecte, les spores fongiques et les autres protozoaires seront également colorés, mais auront généralement des parois plus fines, le cytoplasme sera bleu/pourpre avec des noyaux colorés en magenta.

Dans le but d'obtenir une quantification plus précise, plus robuste et plus significative des niveaux d'infections par *Nosema* parmi les abeilles, un procédé normalisé doit être utilisé. Un protocole adéquat est le suivant :

L'échantillon choisi doit être composé des abeilles les plus âgées ; les abdomens de 10 individus vont être broyés dans 5 ml d'eau à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Quand les morceaux de tissu sont assez fins, la suspension est filtrée à l'aide de deux couches de mousseline (tissu de coton lâchement tissé) dans un entonnoir menant à un tube gradué à centrifuger. Le pilon et le mortier sont rincés avec 5 ml d'eau. Ce deuxième sous-échantillon est également filtré. Le contenu des tubes est égalisé avec de l'eau ; les suspensions sont ensuite centrifugées à 800 g pendant 6 min. Les surnageants sont décantés et les tubes sont complétés à 10 ml. En utilisant des pipettes jetables et une ampoule en caoutchouc, les culots sont remis en suspension par aspirations-refoulements répétés. Quand la solution semble être homogène, un volume d'échantillon déterminé est pris et déposé sous la lamelle d'un hémocytomètre (chambre permettant de compter les hématocytes). Après quelques minutes les spores se sont déposées au fond de la chambre. Les spores de *Nosema* semblent transparentes mais avec un contour foncé très distinct et mesurent entre 5 à 7 μm de long et 3 à 4 μm de large. Elles sont plus facilement observables au grossissement $\times 400$ et avec un système optique à champ lumineux ou contraste de phase. Le nombre de spores dans chaque carré est compté. Lorsque la spore se trouve à cheval sur deux carrés, seules les spores chevauchant les rebords gauches et supérieurs du carré sont comptabilisées. Une spore de *Nosema apis*, observée dans chaque carré de la grille millimétrée de l'hémocytomètre ($25 \times 16 = 400$ petits carrés), équivaut à une moyenne de 10 000 spores par abeille. Si aucune spore n'est observée, le résultat devra indiquer « non détecté », mais cela ne signifie pas que les abeilles ne sont pas infectées. Les organismes accrédités décideront du niveau d'infection toléré pour chaque utilisation.

Une technique de laboratoire permet de détecter simultanément des spores de *Nosema* et des kystes de *M. mellificae* en observant 30 à 60 individus par colonie. Une suspension d'abdomens d'abeilles mortes est préparée par broyage dans 5 à 10 ml d'eau ; le volume de l'eau est ajusté selon le nombre et l'état des abeilles. La suspension doit être filtrée pour éliminer les débris qui pourraient interférer avec l'observation, d'abord par un filtre à 100 µm puis par un autre à 40 µm. Les débris des tubes de Malpighi traversent le filtre de 100 µm, mais sont stoppés sur celui de 40 µm. Les suspensions sont placées sur une lame avec grille de comptage et observées en microscopie au grossissement × 400. Seulement quelques tubules contiennent des kystes après une infection de *M. mellificae*. Dans ce cas là, la structure normale des tubes de Malpighi n'est pas visible. Seuls les kystes à l'intérieur des tubes de Malpighi peuvent être pris en compte pour le diagnostic, car les kystes de *M. mellificae* sont souvent confondus avec les spores de champignon et les cellules de levure.

b) Culture

Il n'existe aucune méthode de culture pour la croissance de ces organismes.

c) Réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Différentes techniques ont été mises au point pour distinguer *N. apis* de *N. ceranae*. Une PCR multiplex est décrite ci-dessous avec laquelle les deux types peuvent être identifiés en même temps (15).

• Préparation de l'échantillon pour la PCR

Les abdomens de 10 à 20 abeilles adultes sont mis à macérer dans 10 ml d'eau distillée (qualité pour PCR) et la suspension est filtrée puis centrifugée à 800 *g* pendant 6 min. Pour l'extraction de l'ADN, la germination des spores est induite avec 200 µl de tampon de germination préparé extemporanément (0,5 M de chlorure de sodium, 0,5 M de carbonate hydrogène de sodium, pH ajusté à 6 avec de l'acide orthophosphorique), et le mélange est incubé à 37 °C pendant 15 min. L'ADN est facilement extrait en suivant les procédures classiques ou en utilisant un kit disponible dans le commerce, tel que le kit High Pure PCR Template Preparation (No. 1796828 Roche Diagnostic).

• PCR multiplex

Avec cette technique les deux microsporidies (*N. apis* et *N. ceranae*) peuvent être distinguée en une seule PCR car les amorces utilisées sont spécifiques et n'interfèrent pas entre elles. Les réactions de PCR sont réalisées dans des volumes de 50 µl contenant 5 µl de matrice ADN, 25 µl du mélange réactionnel (High Fidelity PCR Master Mixture : catalogue no. 12140314001; Roche Diagnostic), 0,4 µM de chaque amorce, 0,4 mM de chaque désoxynucléotide triphosphate, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mg/ml de sérumalbumine bovine, 0,1 % de Triton X-100 et 5 µl de matrice ADN de *N. apis* et de *N. ceranae*. Les paramètres de l'amplification sont : une étape d'initiation de la PCR de 2 min. à 94 °C, suivie de 10 cycles de 15 s à 94 °C, 30 s à 61,8 °C et 45 s à 72 °C puis de 20 cycles de 15 s à 94 °C, 30 s à 61,8 °C et 50 s à 72 °C plus un cycle d'élongation de 5 s après chaque cycle successif et une étape finale d'élongation de 7 min. à 72 °C. Des témoins négatifs (obtenus après extraction de l'ADN) doivent être inclus dans chaque réaction de PCR.

Les poids moléculaires des produits de PCR sont déterminés par électrophorèse sur un gel à 2 % d'agarose TAE (acide tétra-acétique tris-acétate-éthylène diamine) dans du tampon TAE, avec une coloration au bromure d'éthidium et une visualisation utilisant une illumination aux rayons ultra-violets.

Sélection d'amorces pour la détection de *N. ceranae* et de *N. apis* dans la PCR multiplex

Amorce	Séquence ^a	Taille du produit de PCR (pb)	Spécificité
218MITOC FOR	5'- <u>CGGCG</u> ACGATGTGATATGAAA-ATATTAA-3'	218–219 ^b	<i>N. ceranae</i>
218MITOC REV	5'- <u>CCC</u> GGTCATTCTCAAACAAAA-AACCG-3'		
321APIS FOR	5'- <u>GGGGG</u> GCATGTCTTTGACGTACTATGTA-3'	321	<i>N. apis</i>
321APIS REV	5'- <u>GGGGG</u> GCGTTTAAATGTGAAACAACATATG-3'		

a Les séquences GG ajoutées aux amorces sont soulignées.

b Il existe une différence de 1 pb dans la taille de l'amplicon de *N. ceranae* selon les séquences de *N. ceranae* disponibles dans la base GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2. Épreuves sérologiques

Il n'existe pas d'épreuve sérologique applicable pour le diagnostic.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Aucun vaccin ni aucun produit biologique pour le diagnostic n'est disponible.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANDERSON D.L. & GIACON H. (1992). Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. *J. Econ. Entomol.*, **85**, 47–51.
2. BAILEY L. (1957). Comb fumigation for *Nosema* disease. *Am. Bee J.*, **97**, 24–26.
3. BAILEY L. (1962). Bee diseases. In: Report of the Rothamsted Experimental Station for 1961, Harpenden, UK, 160–161.
4. BAILEY L. (1967). *Nosema apis* and dysentery of the honey bee. *J. Apic. Res.*, **6**, 121–125.
5. BAILEY L. (1981). Honey Bee Pathology. Academic Press, London, UK.
6. BULLA (1977). In: Comparative Pathobiology. Vol. 1: Biology of *Microsporidia* (1976); Vol. 2: Systematics of the *Microsporidia*, Lee A. & Cheng T.C., eds. Plenum Press, New York, USA, and London, UK.
7. CANTWELL G.E. (1970). Standard methods for counting nosema spores. *Am. Bee J.*, **110**, 222–223.
8. CANTWELL G.E. & SHIMANUKI H. (1970). The use of heat to control *Nosema* and increase production for the commercial beekeeper. *Am. Bee J.*, **110**, 263.
9. DE RUITER A. & VAN DER STEEN J. (1989). Disinfection of combs by means of acetic acid (96%) against *Nosema*. *Apidologie*, **20**, 503–506.
10. FRIES I. (1988). Contribution to the study of *Nosema* disease (*Nosema apis* Z.) in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Rapport 166, Sveriges Landbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens utfodring och vård, Uppsala, Sweden.
11. FRIES I., FENG F., DA SILVA A., SLEMENDA S.B. & PIENIAZEK N.J. (1996). *Nosema ceranae* n.sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a Microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur. J. Protistol.*, **32**, 356–365.
12. HIGES M., MARTÍN R. & MEANA A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* **92**, 93–95.
13. HUANG W.F., JIANG J.H., CHEN Y.W. & WANG C.H. (2005). Complete rRNA sequence of *Nosema ceranae* from honey bee (*Apis mellifera*). <https://gra103.aca.ntu.edu.tw/gdoc/F90632004a.pdf> (Date: 2005-11-25).
14. KLEE J., BESANA A.M., GENERSCH E., GISDER S., NANETTI A., TAM D.Q., CHINH T.X., PUERTA F., RUZ J.M., KRYGER P., MESSAGE D., HATJINA F., KORPELA S., FRIES I., PAXTON R.J. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.*, **96**, 1–10.
15. MARTIN-HERNANDEZ R., MEANA A., PRIETO L., SALVADOR A.M., GARRIDO-BAILON E. & HIGES M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6331–6338.
16. MATHESON A. (1996). World bee health update 1996. *Bee World*, **77**, 45–51.
17. MORGENTHALER D. (1939). Die ansteckende Frühjahrsschwindsucht (*Nosema-Amoeben*-Infection) der Bienen. Erweiterter Sonderdruck aus der Schweizerischen Bienenzeitung Heft 2, 3 und 4.

18. STECHE W. (1985). Revision of ZANDER & BOTTCHE. Nosematose. *In*: Krankheiten der Biene, Handbuch der Bienenkunde.
19. WEBSTER T.C. (1993). *Nosema apis* spore transmission among honey bees. *Am. Bee J.*, **133**, 869–870.
20. WEISER J. (1961). Die Mikrosporidien als Parasiten der Insekten. Verlag Paul Parey, Hamburg and Berlin, Germany.
21. WHITE G.F. (1919). *Nosema* Disease. United States Department of Agriculture Bull., No. 780, 54 pp.

*

* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour les Maladies des abeilles (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

INFESTATION PAR LE PETIT COLÉOPTÈRE DES RUCHES (*Aethina tumida*)

RÉSUMÉ

Le petit coléoptère des ruches, Aethina tumida Murray 1867 (Coleoptera : Nitidulidae), est un parasite destructeur des colonies d'abeilles mellifères. Les adultes et les larves se nourrissent du couvain, du miel et du pollen, entraînant la mort du couvain, la fermentation du miel et la destruction des cadres, avec souvent pour résultat l'effondrement total du nid et la désertion des abeilles. Le petit coléoptère des ruches peut être un grave problème dans les mielleries où les cadres, le miel et la cire stockés sont des lieux d'alimentation et de multiplication possibles. Le développement nécessite de 3 à 12 semaines selon la température et la disponibilité de la nourriture. En volant, les petits coléoptères adultes infestent rapidement les colonies.

Identification de l'agent pathogène : *une infestation par Aethina tumida peut être mise en évidence soit indirectement par l'intermédiaire des dommages importants occasionnés aux colonies ou directement par l'intermédiaire des œufs, des larves et des adultes. Un diagnostic précoce peut être fait après ouverture de la colonie en cherchant des coléoptères adultes sur le plateau de la ruche ou dissimulés dans les rayons. Des acaricides et des insecticides sont actuellement employés pour tuer les coléoptères et les larves présents à l'intérieur comme à l'extérieur de la ruche. Des pièges peuvent être utilisés pour mettre en évidence les coléoptères.*

Épreuves sérologiques : *aucune épreuve sérologique n'est applicable.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *aucun produit biologique n'est disponible.*

A. INTRODUCTION

Le petit coléoptère des ruches, *Aethina tumida* Murray, Coleoptera : Nitidulidae (17), est originaire de l'Afrique Subsaharienne (12) mais a été introduit aux États-Unis (1996), en Égypte (2000) et en Australie (2002) (18). Il a été introduit au Canada en 2002 mais ne s'y est pas établi ; il y a été réintroduit en 2006, mais on n'a pas déterminé s'il s'y était établi. *Aethina tumida* peut se disséminer par le vol, les apiculteurs transhumants ou le transport des produits infestés de la ruche (13, 18). Des larves et des œufs d'*A. tumida* ont été identifiés dans des cages à reines importées au Portugal (2004), mais toutes les colonies d'abeilles furent immédiatement détruites (comm. pers.). Dans son territoire d'origine, on le considère habituellement comme un parasite mineur et sa reproduction est plus facile dans les colonies faibles et stressées ou dans des ruches récemment désertées (18). Cependant, dans les nouvelles zones d'infestation, il peut endommager considérablement les colonies des sous-espèces d'abeilles mellifères européennes (3, 11, 13, 18).

1. Cycle de vie

Les femelles d'*A. tumida* s'accouplent dans la colonie (plus de 1 000 coléoptères adultes peuvent pénétrer dans une colonie [11]) et pondent plusieurs œufs en paquets caractéristiques dans les petites fissures, dans les cellules ou dans le couvain operculé (9, 15, 18). Les larves naissent après 1 à 6 jours et se nourrissent de pollen, de miel et de couvain d'abeille comme les adultes (15, 18, 22). Des coléoptères adultes peuvent également être nourris par des abeilles ouvrières par trophallaxie (8). Le développement larvaire dure de 8 à 29 jours (selon la disponibilité de la nourriture et la température [8, 15, 18, 22]), en fonction du moment où elles atteignent la phase mobile (15) et migrent dans le sol pour la métamorphose, la plupart du temps à proximité de la ruche (21). La métamorphose prend 2 à 12 semaines selon la température et l'humidité du sol (7). Les jeunes adultes quittent le

sol et peuvent voler sur de longues distances (>10 km) pour rechercher de nouvelles colonies à parasiter, accomplissant de ce fait le cycle de vie d'*A. tumida*.

Les raisons de la différence apparente d'impact du petit coléoptère des ruches entre son territoire d'origine et les nouveaux territoires infestés ne sont pas bien comprises (3). Elles peuvent inclure des différences comportementales quantitatives entre les sous-espèces africaines et européennes d'abeilles mellifères, des différentes techniques apicoles et des différences climatiques (3, 13, 18).

Les coléoptères adultes peuvent survivre jusqu'à 6 mois. Les femelles peuvent pondre environ 1 000 œufs au cours de leur vie (15).

Bien que les dommages dus aux adultes soient relativement mineurs, ils peuvent toutefois causer la désertion de la colonie (6). Si elle n'est pas empêchée par les abeilles (9, 19), la croissance larvaire (plusieurs centaines ou milliers d'individus) est habituellement associée à la fermentation du miel, cause des dégâts importants aux cadres et provoque souvent l'effondrement complet des rayons (12). Des pertes économiques peuvent également être associées aux infestations de coléoptères dans les mielleries. Les conditions environnementales généralement liées aux mielleries, telles que les hautes températures et l'humidité, fournissent les conditions optimales pour le développement des coléoptères. Une faible reproduction cachée peut également se produire dans les débris ou sur les plateaux des ruches sans aucun signe de dommages visibles pour l'apiculteur (22).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Le premier signe d'une infestation par *A. tumida* est la présence dans la colonie (fig. 1) de coléoptères adultes : longueur environ 5 mm et largeur environ 3 mm, les femelles sont légèrement plus longues que les mâles (10), leur couleur va du brun foncé au noir (plus claire peu de temps après l'éclosion). Pendant les visites de colonies, les adultes évitent la lumière du soleil, se cachent et on peut les observer courant pour se dissimuler dans les coins ou d'une façon caractéristique sur les cadres. Des adultes peuvent être confondus avec d'autres coléoptères de la même famille, qui peuvent également être associés aux colonies (par exemple *Cychramus luteus* [20]).



Fig. 1. *Aethina tumida* adulte. Photo de N. Ruppert.

a) Œufs, larves et pupes de petit coléoptère

Les œufs sont blancs en forme de haricot (environ les 2/3 de la taille d'un œuf d'abeille mellifère) et pondus en paquets (jusqu'à 210) dans des fissures, sur le plateau de la ruche, sur les cadres et dans le couvain operculé (9). Les larves sont blanchâtres, souvent couvertes d'une fine couche gluante, mesurent jusqu'à 1,2 cm long (phase mobile) et ont trois paires de pattes et d'épines dorsales. On peut trouver les larves creusant les cadres (15) ou dans les débris (23). L'infestation larvaire est typiquement associée à une odeur putride (par exemple orange en décomposition). Les larves mobiles laissent souvent des traînées à l'intérieur et en dehors de la colonie. On peut trouver de telles larves et pupes mobiles (blanchâtres, environ 5 mm de long et 3 mm de large) dans de petits cocons de métamorphose à une profondeur de 1 à 20 cm dans le sol, généralement à proximité des colonies (< 180 cm, [21]).

b) Examen des colonies

Lors de la visite des colonies d'abeilles pour rechercher *A. tumida*, un examen de la ruche peut fournir une première indication de l'infestation. On peut observer des coléoptères adultes cachés dans les cellules et dans les débris. Pour commencer l'examen de la colonie, on enlève le chapeau de la ruche et on le retourne sur le sol à côté de la ruche. On enlève le corps de ruche et les hausses (dans le cas de colonies doubles) et on les place sur le chapeau précédemment retourné. On place le plateau sur le dessus de la pile. Quelques minutes plus tard, on enlève les différentes parties et on recherche les petits coléoptères à

l'intérieur du chapeau retourné. Les rayons sont ensuite examinés un par un pour rechercher les adultes, les larves et les œufs. Par temps frais, les adultes ont tendance à rester près ou dans la grappe d'abeilles. En période plus chaude, on peut trouver les petits coléoptères plutôt sur le plateau ou sur les cadres de rive.

c) Examen des colonies par piégeage

Un diagnostic plus simple est possible en employant des cartons ondulés. De tels cartons permettent aux petits coléoptères de se cacher dans les plis du carton sans que les abeilles puissent y entrer. On peut les placer sur le plateau. Pour détecter les petits coléoptères, placer un morceau de carton ondulé (15 × 15 cm), en enlevant une des parties lisses pour mettre à nu les ondulations, le côté ondulé vers le bas. Le recouvrir d'une plaque de bois pour ajuster le dessous des cadres sur le plateau. Laisser le carton dans la colonie au maximum 3 jours, puis l'enlever et rechercher les coléoptères adultes et les larves. Des acaricides peuvent être employés pour tuer les adultes des cartons. Les débris et toutes les zones auxquelles les abeilles n'ont aucun accès devraient également être examinés soigneusement.

2. Épreuves sérologiques

Aucune épreuve sérologique n'est disponible ni applicable pour un diagnostic en routine au laboratoire.

3. Traitement

Dans les pays infestés par *A. tumida*, le contrôle est particulièrement axé sur des traitements chimiques avec des acaricides et des insecticides (1, 2, 11). Des acaricides, non-toxiques pour les abeilles, sont employés pour tuer les adultes dans des pièges à l'intérieur des colonies (11). De même, des insecticides sont employés par aspersion sur le sol pour tuer les larves et les pupes mobiles (1, 2). De tels traitements comportent des risques à la fois de résistance du parasite au pesticide et de résidus dans les produits de ruche (18). D'autres possibilités de contrôles plus acceptables sont modérément efficaces jusqu'à présent (3, 13, 14, 18) et actuellement à l'étude (3-5, 13, 14, 16).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Aucun produit biologique n'est disponible.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BAXTER J.R., ELZEN P.J., WESTERVELT D., CAUSEY D., RANDALL C., EISCHEN F.A. & WILSON W.T. (1999). Control of the small hive beetle in package bees. *Am. Bee J.*, **139**, 792–793.
2. BAXTER J.R., ELZEN P.J. & WILSON W.T. (1999). Gardstar 40% EC (Permethrin) efficacy trials as a ground drench for the control of small hive beetle around honey bee colonies. Tektran, USDA Agricultural Research Service, 1 pp.
3. ELLIS J.D. (2004). The Ecology and Control of Small Hive Beetles. PhD dissertation, Rhodes University, Grahamstown, South Africa.
4. ELLIS J.D., DELAPLANE K.S., HEPBURN H.R. & ELZEN P.J. (2003). Efficacy of modified hive entrances and a bottom screen device for controlling *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) infestations in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. *J. Econ. Entomol.*, **96**, 1647–1652.
5. ELLIS J.D., DELAPLANE K.S. & HOOD W.M. (2001). Small hive beetle (*Aethina tumida*) weight, gross biometry, and sex proportion at three locations in the southeastern United States. *Am. Bee J.*, **142** (7), 520–522.
6. ELLIS J.D., HEPBURN H.R., DELAPLANE K., NEUMANN P. & ELZEN P.J. (2003). The effects of adult small hive beetles, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae), on nests and flight activity of Cape and European honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, **34**, 399–408.
7. ELLIS J.D., HEPBURN H.R., LUCKMANN B. & ELZEN P.J. (2004). The effects of soil type, moisture, and density on pupation success of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Environ. Entomol.*, **33**, 794–798.

8. ELLIS J.D., PIRK C.W.W., HEPBURN H.R., KASTBERGER G. & ELZEN P.J. (2002). Small hive beetles survive in honeybee prisons by behavioural mimicry. *Naturwissenschaften*, **89**, 326–328.
9. ELLIS J.D., RICHARDS C.S., HEPBURN H.R. & ELZEN P.J. (2003). Oviposition by small hive beetles elicits hygienic responses from Cape honeybees. *Naturwissenschaften*, **90**, 532–535.
10. ELLIS J.D., RONG I.H., HILL M.P., HEPBURN H.R. & ELZEN P.J. (2004). The susceptibility of small hive beetle (*Aethina tumida* Murray) pupae to fungal pathogens. *Am. Bee J.*, **144** (6), 486–488.
11. ELZEN P.J., BAXTER J.R., WESTERVELT D., RANDALL C., DELAPLANE K.S., CUTTS L. & WILSON W.T. (1999). Field control and biology studies of a new pest species, *Aethina tumida* Murray (Coleoptera, Nitidulidae) attacking European honey bees in the Western hemisphere. *Apidologie*, **30**, 361–366.
12. HEPBURN H.R. & RADLOFF S.E. (1998). Honeybees of Africa. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
13. HOOD M.W. (2004). The small hive beetle, *Aethina tumida*: a review. *Bee World*, **85**, 51–59.
14. HOOD W.M. & MILLER G.A. (2005). Evaluation of an upper Hive entrance for control of small hive beetles (Coleoptera: Nitidulidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, **98**, 1791–1795.
15. LUNDIE A.E. (1940). The small hive beetle *Aethina tumida*, Science Bulletin 220, Dep. Agr. Forestry, Government Printer, Pretoria, South Africa.
16. MUERRLE T.M., NEUMANN P., DAMES J.F., HEPBURN H.R. & HILL M.P. (2006). Susceptibility of Adult Small Hive Beetle to Entomopathogenic Fungi. *J. Econ. Entomol.*, **99**, 1–6.
17. MURRAY A. (1867). List of Coleoptera received from Old Calabar. *Ann. Magazine Nat. Hist.*, London, **19**, 167–179.
18. NEUMANN P. & ELZEN P.J. (2004). The biology of the small hive beetle (*Aethina tumida*, Coleoptera: Nitidulidae): Gaps in our knowledge of an invasive species. *Apidologie*, **35**, 229–247.
19. NEUMANN P. & HÄRTEL S. (2004). Removal of small hive beetle (*Aethina tumida*) eggs and larvae by African honeybee colonies (*Apis mellifera scutellata*). *Apidologie*, **35**, 31–36.
20. NEUMANN P. & RITTER W. (2004). A scientific note on the association of *Cychramus luteus* (Coleoptera: Nitidulidae) with honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie*, **35**, 665–666.
21. PETTIS J. & SHIMANUKI H. (2000). Observations on the small hive beetle, *Aethina tumida*, Murray, in the United States. *Am. Bee J.*, **140**, 152–155.
22. SCHMOLKE M.D. (1974). A study of *Aethina tumida*: the small hive beetle, Project Report, University of Rhodesia, Zimbabwe, pp. 178.
23. SPIEWOK S. & NEUMANN P. (2006). Cryptic low-level reproduction of small hive beetles in honeybee colonies. *J. Apic. Res.*, **45**, 47–48.

LECTURE COMPLÉMENTAIRE

Une publication de la FAO, « Honey bee diseases and pests: a practical guide », W. Ritter & P. Akkratanakul (eds). Agricultural and Food Engineering Technical Report No. 4. FAO, Rome, Italie, 42 pp. ISSN 1814-1137 TC/D/A0849/E, est disponible gratuitement à l'adresse internet suivante :

http://www.fao.org/WAICENT/faoINFO/AGRICULT/ags/subjects/en/industFoodAg/pdf/AGST_techrep_4.pdf

*

* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour les maladies des abeilles (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel Terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int)

INFESTATION DES ABEILLES MELLIFÈRES PAR *TROPILAEELAPS* (*Tropilaelaps* spp.)

RÉSUMÉ

Les acariens du genre *Tropilaelaps* sont des parasites du couvain d'abeille. S'alimentant sur les larves et les nymphes d'abeilles, ils causent des malformations du couvain, la mort des abeilles et le déclin progressif des colonies. Le développement est d'environ une semaine et les acariens sont dispersés sur les abeilles. Il existe au moins 4 espèces dans le genre *Tropilaelaps*. Chaque espèce est étroitement associée à une espèce particulière d'abeille géante d'Asie. Deux espèces (*Tropilaelaps clareae* et *Tropilaelaps mercedesae*) sont des parasites dangereux pour *Apis mellifera*, tandis que les deux autres espèces (*Tropilaelaps koenigerum* et *Tropilaelaps thaii*) semblent ne pas poser de problème (1).

Identification de l'agent pathogène : Des méthodes morphologiques et moléculaires existent pour identifier chaque espèce (1). Une infestation par *Tropilaelaps* peut être observée directement sur des abeilles ou observée dans les débris de ruche. Un couvain irrégulier, des abeilles immatures mortes ou mal formées, des abeilles aux ailes déformées rampant à l'entrée de la ruche, et particulièrement la présence d'acariens allongés, larges, de couleur rouge-brun, courant rapidement sur les cadres, permettent le diagnostic lors de la présence de *T. clareae*. Un diagnostic précoce peut être fait après ouverture des cellules de couvain et observation des acariens immatures et adultes présents dans celles-ci. La ruche (colonie) peut être traitée avec divers produits chimiques qui entraînent la chute des acariens des cadres et des abeilles. Des bandes collantes placées au fond de la ruche peuvent être employées pour collecter et observer les débris et les acariens de la ruche.

Épreuves sérologiques : il n'existe pas d'épreuves sérologiques applicables pour le diagnostic.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : aucun vaccin ni aucun produit biologique pour le diagnostic n'est disponible.

A. INTRODUCTION

L'espèce d'acariens *Tropilaelaps clareae* qui était auparavant considérée comme ubiquiste en Asie, est maintenant divisée en deux espèces. *Tropilaelaps clareae* est trouvée en Asie où elle est parasite de l'espèce indigène d'abeille *Apis dorsata breviligula*. Elle est aussi parasite de l'espèce d'abeille *A. mellifera*, qui a été introduite aux Philippines, et de l'espèce indigène *A. dorsata binghami* sur l'île Sulawesi en Indonésie. *Tropilaelaps mercedesae*, qui jusqu'à aujourd'hui était confondue avec *T. clareae*, ainsi que *T. koenigerum*, est un parasite de l'espèce indigène *A. dorsata dorsata* sur le continent asiatique et en Indonésie (à l'exception de l'île Sulawesi). Elle est aussi parasite de *A. mellifera* qui a été introduite dans ces régions ; avec une autre espèce, *T. thaii*, elle parasite aussi *A. laboriosa* dans les régions montagneuses de l'Himalaya (1).

1. Cycle biologique

La femelle fondatrice de *Tropilaelaps* (ou les femelles puisqu'en effet plus d'une douzaine peut apparaître à partir d'une seule cellule) pond de 1 à 4 œufs sur des larves matures d'abeille peu avant l'operculation de la cellule de couvain. Le couvain de faux-bourdon est préféré par *Tropilaelaps* et est souvent totalement parasité (4). La progéniture des acariens, habituellement un mâle et plusieurs femelles s'alimentent sur les larves et les

endommagent sérieusement. Le développement des acariens nécessite environ une semaine. Les adultes, y compris la femelle fondatrice, émergent avec l'abeille et recherchent de nouveaux hôtes.

Un cycle de vie court et un séjour très bref sur les abeilles adultes, expliquent pourquoi les populations de *T. clareae* augmentent plus rapidement que celles des acariens *Varroas*. Lorsque les deux acariens, *T. clareae* et *Varroa destructor* infestent la même colonie, ils entrent en concurrence directe (4, 13). Lorsque les deux espèces d'acariens se retrouvent dans le même couvain, la reproduction des deux acariens diminue (12).

La survie hors de la cellule sur des abeilles adultes est très brève (seulement 1 à 2 jours) car *Tropilaelaps* ne peut pas percer la membrane intersegmentaire des abeilles adultes. Pour *Tropilaelaps* spp., le temps passé sur ces abeilles est important pour comprendre le cycle de vie. De récentes recherches suggèrent que la période pourrait durer de 5 à 10 jours (15, 16). Les femelles acariens pleines meurent dans les 2 jours à moins qu'elles ne déposent leurs œufs (17).

L'infestation par *Tropilaelaps* cause la mort de beaucoup de larves d'abeilles (jusqu'à 50 %), donnant un aspect irrégulier au couvain et quelques cadavres qui peuvent partiellement dépasser des cellules. Beaucoup d'abeilles mal formées, avec des abdomens déformés, des ailes tronquées et des pattes déformées ou manquantes sont visibles. Certaines des abeilles affectées rampent à l'entrée de la ruche (2). De plus, des opercules perforés sont visibles, résultant de l'activité de nettoyage des ouvrières, qui expulsent les nymphes infestées ou les jeunes adultes. Quelques colonies infestées essaient, portant les acariens à un nouveau site.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Le premier signe d'une infestation par les espèces de *Tropilaelaps* est souvent la présence d'acariens ovales, de couleur rouge brun, longs (Figs. 1 et 2). *Tropilaelaps clareae* (< 1 mm de longueur) et *T. mercedesae* (< 9 mm de longueur) sont identiques à l'exception de leur taille. *Tropilaelaps koenigerum* est légèrement plus petit, environ 0,7 mm de longueur (5). Les femelles sont différentes quant à la structure de leurs plaques ventro-anales et de la dent sub-apicale des chélicères (1). Les espèces de *Tropilaelaps* peuvent facilement être identifiées et différenciées des acariens *Varroas* à l'aide d'une loupe binoculaire au grossissement $\times 10$. Le corps des acariens *Varroas* est plus large que long, ils se déplacent lentement, tandis que le corps de *Tropilaelaps* est ovale, avec un sillon ventral plus ou moins sclérosé (Fig. 3), ils se déplacent rapidement.

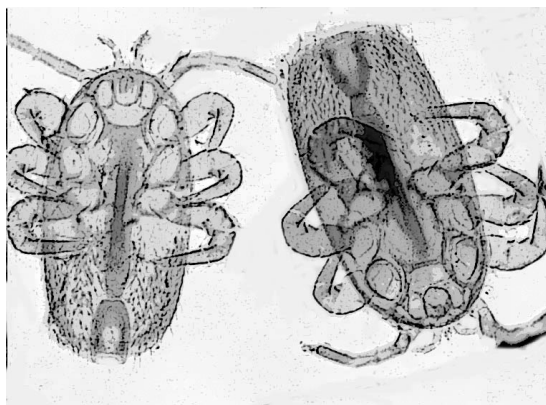


Fig. 1. *Tropilaelaps clareae*. Photographie de J. Waddell.



Fig. 2. *Tropilaelaps* sur une larve de *Apis dorsata*. Photographie par D. Anderson.

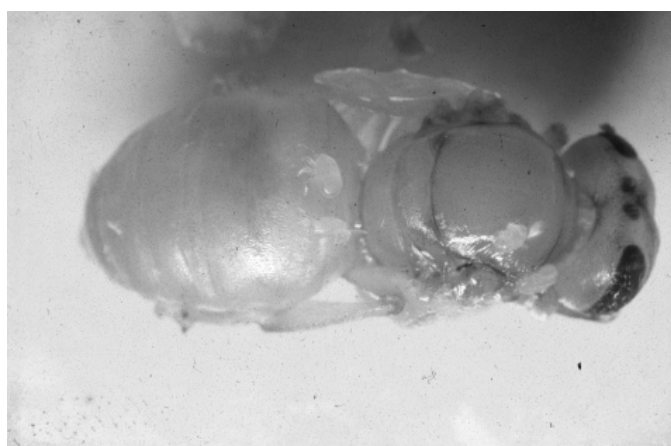


Fig. 3. Descendance de *Tropilaelaps* sur une puppe de *Apis mellifera*.
Photographie par W. Ritter.

a) Collecte des acariens

Les méthodes pour collecter des acariens consistent en un mélange d'éther ou de sucre (13). Prélever environ 100 à 200 abeilles dans un bocal à couvercle. Secouer les abeilles dans le bocal ou utiliser un système de vide. Faire en sorte que les abeilles se retrouvent au fond du bocal ; une couche d'environ 2 à 5 cm d'abeilles devrait se déposer sur le fond. Enlever le couvercle et pulvériser pendant 2 s de l'éther liquide. Alternativement, utiliser de l'alcool à 70 % ou de l'eau savonneuse pour recouvrir les abeilles ou ajouter du sucre en poudre environ 25 g (ou de la farine). Si on utilise l'éther, replacer le couvercle et agiter ou remuer le bocal pendant environ 10 s ; les acariens devraient rester collés aux parois. Si on utilise du savon ou de l'alcool, agiter puis filtrer les abeilles avec un tissu grossier ou un tamis ; les acariens seront dans le liquide. Si on utilise le sucre ou une autre poudre, mettre le tamis (tel que le tissu) sur le bocal et secouer les acariens au dessus d'une feuille blanche pour les compter ; répéter l'opération toutes les 2 min. Pour un comptage plus précis, rincer avec de l'alcool ou de l'eau savonneuse pour concentrer tous les acariens.

b) Observation du couvain et de la colonie

Lors du contrôle de la présence *Tropilaelaps* (ou de *Varroa*) dans les colonies d'abeilles, une observation des couvains de faux-bourçons et d'ouvrières peut donner une première indication de l'infestation. Les acariens peuvent être observés dans les cellules de couvain operculées en employant un peigne à miel (avec des dents ressemblant à celles d'une fourchette) pour extraire les nymphes operculées. Les acariens sont clairement visibles. Aux stades les plus jeunes, les acariens sont blanchâtres, presque immobiles, et s'alimentent sur les corps de leurs hôtes ; leurs pièces buccales et leurs pattes antérieures sont fixées à la

cuticule de l'abeille hôte (13). L'ampleur du parasitisme peut être estimée en ouvrant un nombre prédéterminé de cellules de couvain ; les taux d'infestation sont alors calculés en pourcentage de cellules operculées contenant des acariens vivants (3).

c) Observation des langes collants

Un diagnostic précis peut être fait en utilisant un lange collant recouvert d'un filtre, tel que les papiers tue-mouche, qui empêche les abeilles d'évacuer les acariens délogés. La maille doit être assez grande pour que les acariens passent à travers. Faire un lange collant avec des posters, du carton ou tout autre papier rigide et blanc enduit de vaseline ou toute autre substance collante (8, 10, 14), ou employer une feuille de papier peint collant. Couper le papier pour l'adapter au plateau inférieur de la ruche. Couper un morceau de tissu ou une grille pour l'adapter sur le lange collant. Pour empêcher les abeilles de salir le lange, plier les bords extérieurs de la grille pour la soulever du lange. Laisser le lange dans la colonie durant 3 jours, rassembler et examiner les débris pour observer les acariens. Pour un diagnostic plus rapide de la présence d'acariens, enfumer chaque colonie, ajouter 25 g de tabac à pipe dans l'enfumeur. Enfumer les abeilles 6 à 10 fois, fermer la ruche pendant 10 à 20 min. Retirer le lange collant après 10 min et compter les acariens. Des acaricides sont parfois employés pour décrocher les acariens des abeilles, ainsi ceux-ci apparaîtront sur les langes collants.

2. Épreuves sérologiques

Il n'existe pas d'épreuves sérologiques applicables pour le diagnostic.

3. Traitement

Dans les pays avec des infestations de *Tropilaelaps* spp, des formulations à émission lente de fluvalinate contrôlent les *Tropilaelaps* (9, 11), de même que des saupoudrages mensuels avec du soufre (2) et des traitements à l'acide formique (6). L'incapacité de ces acariens de s'alimenter sur des abeilles adultes, ou de survivre plus de quelques jours à l'extérieur des cellules operculées, permet d'employer une méthode alternative qui consiste à mettre en cage la reine pendant quelques semaines. L'acarien, n'ayant plus de larves hôtes, meurt (17, 18).

Plusieurs acaricides utilisés pour le *Varroa* tuent également *Tropilaelaps*. Des bandes de plastique imbibées de fluvalinate (Apistan™) tueront les acariens. Alternativement, la fumée de tabac dans l'enfumeur causera la chute des acariens. Les bandes de papier filtre, disponibles dans certains pays, sont préparées par trempage dans une solution de nitrate de potassium à 15 % auquel sont ajoutées 2 gouttes d'amitraz (habituellement 12,5 %) (9). Après séchage du papier, la bande est allumée et insérée dans la ruche. La fumée cause la chute de beaucoup d'acariens. Une autre méthode est d'utiliser des plateaux ou des garnitures imbibés de 20 ml d'acide formique à 65 % (très caustique, il peut brûler les mains et le visage). Les garnitures sont placées dans les colonies, en haut de la ruche (7).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Aucun vaccin ni produit biologique n'est disponible.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANDERSON D.L. & MORGAN M.J. (2007). Genetic and morphological variation of bee-parasitic *Tropilaelaps* mites (Acari: Laelapidae): new and re-defined species. *Exp. Appl. Acarol.*, **43**, 1–24.
2. ATWAL A.S. & GOYAL N.P. (1971). Infestations of honeybee colonies with *Tropilaelaps*, and its control. *J. Apic. Res.*, **10**, 137–142.
3. BURGETT D.M. & KITPRASERT C. (1990). Evaluation of Apistan™ as a control for *Tropilaelaps clareae* (Acari: Laelapidae), an Asian honey bee brood mite parasite. *Am. Bee J.*, **130**, 51–53.
4. BURGETT M., AKRATANAKUL P. & MORSE R.A. (1983). *Tropilaelaps clareae*: a parasite of honeybees in south-east Asia. *Bee World*, **64**, 25–28.

5. DELFINADO-BAKER M. & BAKER E.W. (1982). A new species of *Tropilaelaps* parasitic on honey bees. *Am. Bee J.*, **122**, 416–417.
6. GARG R., SHARMA O.P. & DOGRA G.S. (1984). Formic acid: an effective acaricide against *Tropilaelaps clareae* Delfinado & Baker (Laelapidae: Acarina) and its effect on the brood and longevity of honey bees. *Am. Bee J.*, **124**, 736–738.
7. HOPPE H., RITTER W. & STEPHEN E. (1989). The control of parasitic bee mites: *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae* with formic acid. *Am. Bee J.*, **129**, 739–742.
8. KOENIGER G., KOENIGER N., ANDERSON D.L., LEKPRAYOON C. & TINGEK S. (2002). Mites from debris and sealed brood cells of *Apis dorsata* colonies in Sabah, (Borneo) Malaysia, including a new haplotype of *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, **33**, 15–24.
9. LUBINEVSKI Y., STERN Y., SLABEZKI Y., LENSKE Y., BEN YOSSEF H. & GERSON U. (1988). Control of *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae* mites using Mavrik under subtropical and tropical climates. *Am. Bee J.*, **128**, 48–52.
10. OSTIGUY N. & SAMMATARO D. (2000). A simplified technique for counting *Varroa* sticky boards. *Apidologie*, **31**, 707–716.
11. PONGTHEP A. (1990). Bee Mites. FAO Agricultural Services Bulletin 68/4. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
12. RATH W., BOECKING O. & DRESCHER W. (1995). The phenomena of simultaneous infestation of *Apis mellifera* in Asia with the parasitic mites *Varroa jacobsoni* OUD, and *Tropilaelaps clareae* Delfinado and Barker. *Am. Bee J.*, **135**, 125–127.
13. RITTER W. & SCHNEIDER-RITTER U. (1988). Differences in biology and means of controlling *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*, two novel parasitic mites of *Apis mellifera*. In: Africanized Honey Bees and Bee Mites, Needham G.R., Page R.E. Jr., Delfinado-Baker M. & Bowman C.E., eds. Ellis Horwood, Chichester, UK, 387–395.
14. SAMMATARO D., GERSON U. & NEEDHAM G.R. (2000). Parasitic mites of honey bees: life history, implications and impact. *Ann. Rev. Entomol.*, **45**, 519–548.
15. WILDE J. (2000). How long can *Tropilaelaps clareae* survive on adult honeybee workers? In: Proceedings of the Euroconference on Molecular Mechanisms of Disease Tolerance in Honeybees (MOMEDITO), held in Kralupy near Prague, Czech Republic, 17–19 October 2000. Bee Research Institute, Dol, Czech Republic, 217–221.
16. WILDE J. (2000). *Varroa destructor* and *Tropilaelaps clareae* in *Apis mellifera* colonies in Nepal. In: Proceedings of the Euroconference on Molecular Mechanisms of Disease Tolerance in Honeybees (MOMEDITO), held in Kralupy near Prague, Czech Republic, 17–19 October 2000. Bee Research Institute, Dol, Czech Republic, 223–238.
17. WOYKE J. (1987). Length of stay of the parasitic mite *Tropilaelaps clareae* outside sealed honeybee brood cells as a basis for its effective control. *J. Apic. Res.*, **26**, 104–109.
18. WOYKE J. (1993). Practical control method of the parasitic bee mite *Tropilaelaps clareae*. *Am. Bee J.*, **133**, 510–511.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour les maladies des abeilles (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

VARROOSE DES ABEILLES MELLIFÈRES

RÉSUMÉ

L'acarien *Varroa destructor* (autrefois *Varroa jacobsoni*) est un parasite des abeilles adultes et de leur couvain. Il perfore la membrane intersegmentaire entre les segments abdominaux de l'abeille adulte pour ingérer l'hémolymphe. Il peut quelquefois être trouvé sur la tête et le thorax. Le nombre de parasites augmente progressivement avec l'augmentation de la surface du couvain et de la croissance de la population, surtout visible en fin de saison lorsque les signes cliniques d'infestation ont été d'abord diagnostiqués. La durée de vie de l'acarien dépend de la température et de l'humidité, mais, en pratique, celle-ci dure de quelques jours à quelques mois.

Identification de l'agent pathogène : les signes cliniques de la varroose ne peuvent être diagnostiqués que dans les derniers stades de l'infection, par l'observation des déchets de la ruche. Ceux produits en été sont particulièrement utiles au diagnostic. Un diagnostic précoce et précis ne peut être fait qu'après l'application d'un traitement qui force l'acarien à se laisser tomber des abeilles ou qui le tue directement. De plus grandes quantités de déchets peuvent être examinées en les faisant flotter dans l'eau. Des abeilles sont lavées avec du white spirit, de l'alcool ou avec un détergent. Cependant, cette méthode est inadaptée à la distribution inégale des acariens et à la taille des échantillons ainsi traités qui est souvent trop petite.

Épreuves sérologiques : il n'y a aucune épreuve sérologique de disponible.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : aucun vaccin ni aucun produit biologique pour le diagnostic n'est disponible.

A. INTRODUCTION

Les acariens *Varroa* sont des parasites des abeilles adultes et du couvain. Quatre espèces ont été répertoriées : *Varroa jacobsoni*, *V. destructor*, *V. underwoodi* et *V. rinderi*. Il y a encore peu de temps, *V. jacobsoni* était considéré comme l'unique *Varroa* affectant *Apis mellifera* dans le monde entier. Cependant, il a été démontré que ces acariens étaient en fait *V. destructor* (Fig. 1).

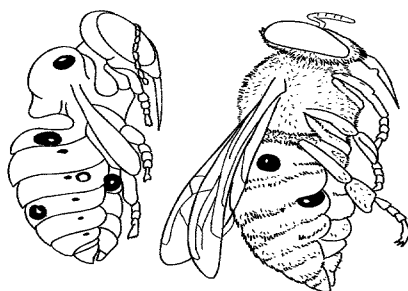


Fig. 1. Varroa sur nymphe et abeille d'adulte.

Gauche : nymphe avec 4 femelles Varroa. Droite : ouvrière avec 2 acariens femelles.

Ils sont responsables de la varroose (1, 2). Les acariens s'insèrent entre les segments abdominaux des abeilles adultes (10) où ils perforent la membrane intersegmentaire afin d'ingérer l'hémolymphe. Ils peuvent également se trouver entre la tête et le thorax. Pour la reproduction, la femelle pénètre dans une cellule de couvain juste avant l'operculation. Elles préfèrent infecter le couvain de faux-bourdon au couvain d'ouvrière. Une fois la cellule de

couvain operculée, les acariens pondent le premier œuf (en général mâle) dans un laps de temps d'environ 2 à 3 jours. Plus tard jusqu'à 7 œufs (en général femelles) sont pondus en 1 à 2 jours. Ceux-ci éclosent sur les nymphes, mais seulement 2 à 3 atteignent le stade adulte (Figs. 2 et 3).

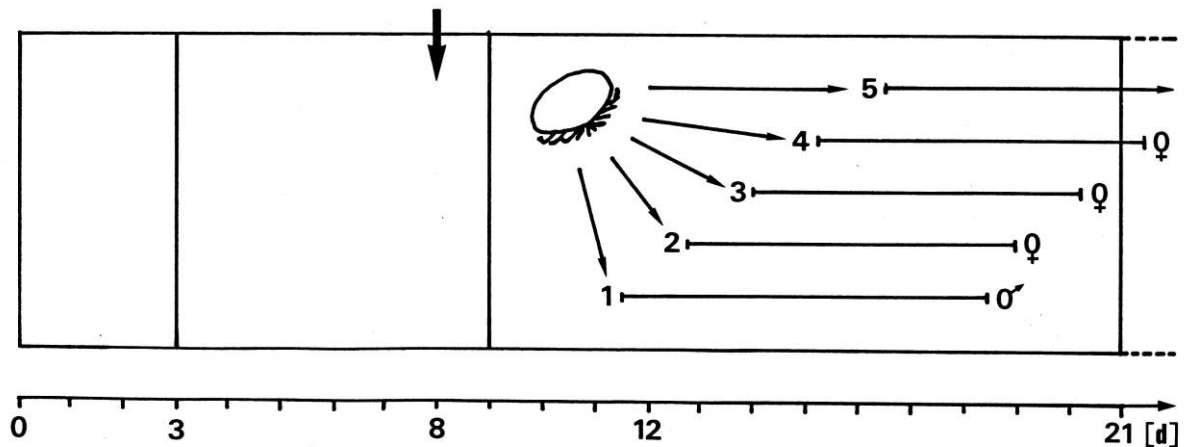


Fig. 2. Oviposition et développement de Varroa dans les cellules du couvain d'ouvrière (jusqu'au 9^e jour environ dans le couvain non operculé, jusqu'au 21^e jour dans le couvain operculé).

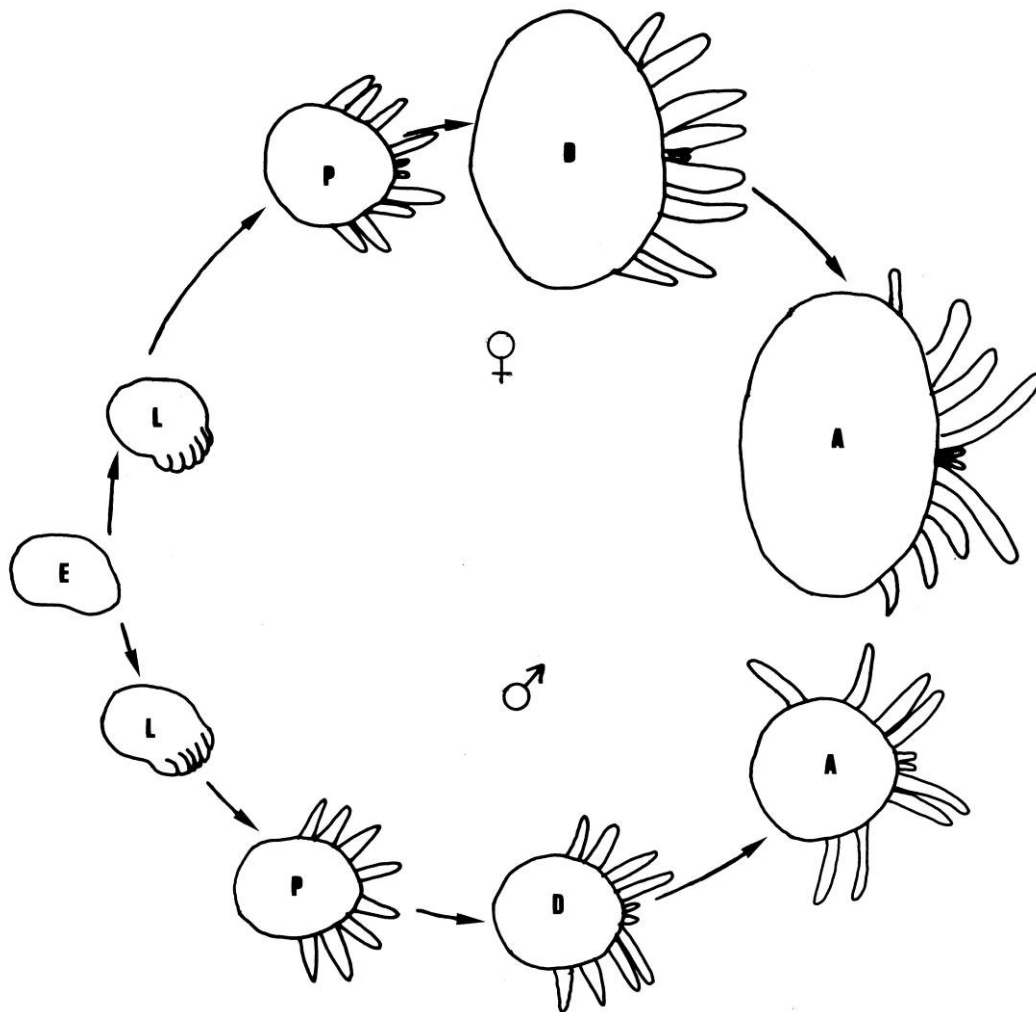


Fig. 3. Développement de Varroa : E = Oeuf, L = Larve, P = Protonympe, D = Deutonymphe, A = Adulte
(Sexe des oeufs, larves et protonymphes ne sont visibles que par examen des chromosomes).

Le nombre d'acariens augmente habituellement lentement au début de la saison. Des signes cliniques peuvent être observés à tout moment pendant la pleine saison, bien que les taux maximum soient généralement atteints en fin de saison (Fig. 4), lorsque les premiers signes cliniques de l'infestation ont été identifiés. L'issue de ce parasitisme est souvent fatale, excepté dans quelques régions, telle que l'Amérique Latine tropicale (6, 12). La durée de vie des acariens sur les stades larvaires ou sur l'abeille adulte dépend de la température et de l'humidité. En pratique, la durée de vie peut varier de quelques jours à quelques mois.

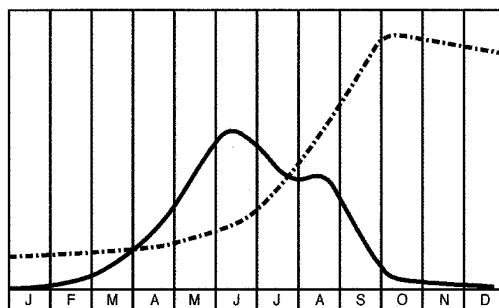


Fig. 4. Graphique des populations d'abeilles et d'acariens sur une année dans l'hémisphère nord en climat tempéré : quantité de couvain (en trait plein) ; nombres d'acariens (ligne en pointillé).

Dans des colonies d'abeilles fortement infestées, les signes cliniques de la varroose sont souvent observés pour la première fois en fin de saison lorsque le couvain est réduit (12). Les infestations importantes sont habituellement atteintes 3 à 4 ans après l'invasion primaire, mais peuvent se produire en quelques semaines lorsque l'infection provient de colonies voisines qui meurent.

Le couvain est essentiellement endommagé par les acariens parasites. Les abeilles et leurs progénitures qui ont été infectées pendant la phase de couvain par un seul acarien parasite montrent différents effets de la maladie, tels qu'une durée de vie raccourcie, des changements de comportement et une sensibilité accrue aux maladies (8). Le parasitisme est critique si plus d'un acarien pénètrent dans la cellule de couvain pour la reproduction. Seulement au stade létal de la maladie, juste avant l'observation des signes cliniques d'effondrement des colonies, des abeilles aux ailes atrophiées et possédant un abdomen raccourci, apparaissent (Fig. 5). Ceci est due à une susceptibilité accrue au virus des ailes déformées et au virus de la paralysie aiguë, ainsi qu'aux pertes d'hémolymphe et aux blessures infligées aux individus (3, 4). Si le couvain meurt peu avant ou après operculation, les signes cliniques de la loque européenne apparaissent sans la présence de l'agent spécifique *Melissococcus pluton*. Si le couvain survit, les abeilles naissantes montrent des changements comportementaux divers et leur durée de vie se raccourcit considérablement (7, 11).

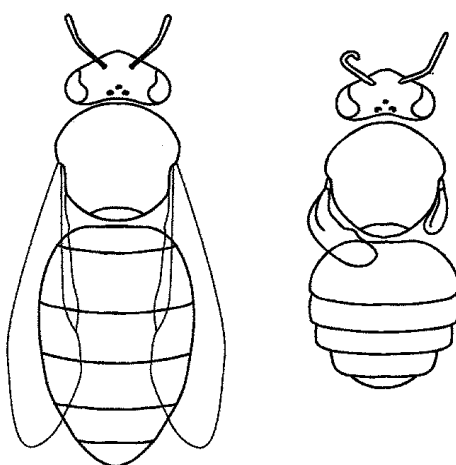


Fig. 5. Effet du Varroa sur la morphologie de l'abeille. Gauche : abeille normale. Droite : abeille fortement attequée par les acariens. Cette abeille émergente a les ailes atrophiées et l'abdomen raccourci.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

L'acarien femelle est d'une couleur brun foncé rougeâtre et a un corps plat et ovale approximativement de 1,1 mm × 1,5 mm. C'est le seul parasite commun d'abeilles qui puisse être observé à l'œil nu (13).

a) Examen des débris

Une méthode facile de diagnostic de la varroose est l'observation des débris produits par les abeilles elles-mêmes. Un grillage dont les mailles laissent passer les acariens *Varroa* est placé sur le plateau de la ruche. Le plateau doit être recouvert soit d'une gaze, ou enduit de graisse, afin que les acariens se collent sur celui-ci.

Les débris produits en quelques jours vers la fin de la saison contiennent essentiellement des acariens facilement observables (9, 11). Cependant, les débris rassemblés en hiver, doivent être observés en laboratoire. Un plateau avec grillage est placé dans la ruche comme précédemment, mais un traitement efficace est employé pour faire tomber les acariens des abeilles, de sorte qu'après un temps donné, un certain nombre d'acariens peuvent être observés sur le plateau de la ruche. Quelques pays exigent l'application de ce diagnostic avec certains traitements chimiques pour prouver l'absence d'acariens.

De grandes quantités de débris peuvent être examinées au laboratoire en faisant flotter ces débris (5).

- **Protocole**

- i) Sécher les débris pendant 24 h ;
- ii) Mouiller les débris avec de l'alcool industriel ;
- iii) Remuer sans interruption pendant environ 1 min ou, si les débris contiennent des particules de cire ou de propolis, remuer pendant 10 à 20 min ;
- iv) Identifier et observer les acariens qui flottent sur la surface.

b) Examen du couvain

La deuxième méthode consiste en l'observation du couvain de faux bourdon, s'il est présent, ou du couvain d'ouvrière, dans le cas contraire.

Lorsqu'un grand nombre d'échantillons est observé, une détermination approximative des niveaux d'infection peut être obtenue.

- **Protocole**

- i) Désoperculer les cellules de couvain avec un couteau ;
- ii) Laver les cellules de couvain directement dans un système de passoire à l'eau chaude avec un pommeau de douche ;
- iii) Collecter les acariens dans une passoire inférieure (largeur de maille 1 mm) tandis que le couvain est recueilli dans la passoire supérieure (largeur de maille 2 ou 3 mm) ;
- iv) Placer le contenu de la passoire sur un plateau clair, où les acariens peuvent facilement être identifiés et comptés.

Lorsqu'un plus petit nombre d'échantillons est étudié, les différentes cellules sont examinées avec une source de lumière appropriée. Après l'ouverture des opercules et extraction du couvain, les cellules infectées peuvent être identifiées par la présence de petites taches blanches – les fèces des acariens – trouvées sur les parois des cellules. Les acariens eux-mêmes doivent être cherchés pour la confirmation, en examinant le fond de la cellule et le couvain pour les acariens encore accrochés.

c) Examen des abeilles

Dans une troisième méthode, environ 200 à 250 abeilles sont prélevées des cadres de couvain non operculé. Les échantillons doivent être pris des deux côtés du cadre de couvain sur 3 cadres différents non operculés. Pour déterminer le pourcentage d'infection d'un rucher, il est nécessaire de collecter et d'analyser des échantillons provenant d'au moins 10 % des ruches et de déterminer plus tard le taux moyen d'infestation basé sur ces différents résultats.

- **Protocole**

- i) Tuer les abeilles dans un récipient adapté par immersion dans l'alcool.
- ii) Remuer le récipient pendant 10 min.
- iii) Séparer les abeilles des acariens à l'aide d'un tamis d'une maille d'environ 2 à 3 mm.

Dans certains cas, les acariens *Varroa* peuvent être confondus avec le pou de l'abeille, *Braula coeca* (Fig. 6). Le dernier est de forme ronde, non ovale. Étant un insecte, il ne possède donc que 3 paires de pattes. Différentes espèces d'acariens peuvent être associées aux acariens *Varroa* sur les abeilles, mais ceux-ci sont facilement reconnaissables. En outre, d'autres acariens parasites, comme des espèces de *Tropilaelaps*, sont connus pour causer les mêmes dommages que l'acarien *Varroa* sur les colonies d'abeilles.

2. Épreuves sérologiques

Aucune épreuve sérologique n'est disponible pour le diagnostic de routine au laboratoire.

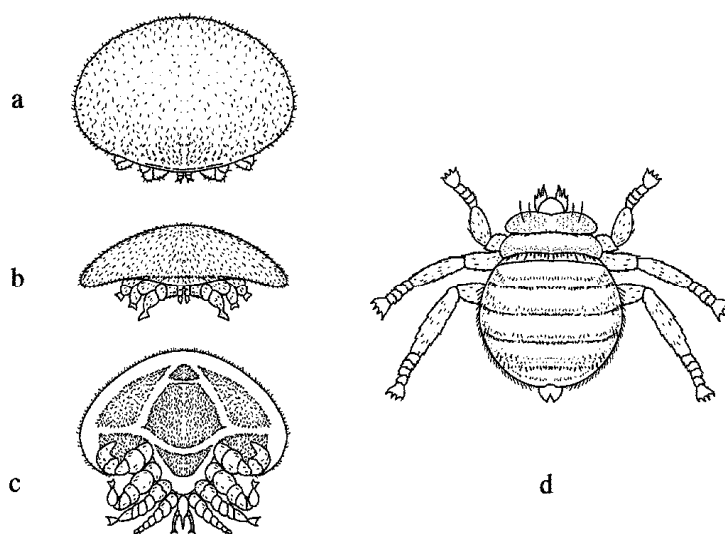


Fig. 6. Schéma de *Varroa destructeur* (autrefois *Varroa jacobsoni* Oudemans) (femelle).

- a. Aspect dorsal
- b. Aspect antérieur
- c. Aspect ventral

Noter la présence d'une carapace sur le dos et les 4 paires de pattes.

- d. le pou de l'abeille (femelle de *Braula coeca*). Noter l'absence de carapace sur le dos et seulement 3 paires de pattes.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'existe aucun vaccin ni aucun produit biologique disponible. Plusieurs médicaments ou substances comme l'acide formique, l'acide oxalique, l'acide lactique et le thymol peuvent être employés pour contrôler les populations d'acariens *Varroa* (<http://www.apis.admin.ch/english/Themes/Varroa.htm>). Certaines lignées d'abeilles avec un meilleur comportement hygiéniques sont moins sensibles à ces parasites.

REMERCIEMENTS

Illustrations de Karl Weiss, extrait de *Bienen-Pathologie*, 1984. Reproduit avec l'aimable permission de l'auteur et de l'*Ehrenwirth-Verlag*, Munich (Allemagne).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANDERSON D.L. (2000). Variation in the parasitic bee mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, **31**, 281–292.
2. ANDERSON D.L. & TRUEMAN J.W.H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.*, **24**, 165–189.
3. BAILEY L. (1981). Honey Bee Pathology. Academic Press, London, UK.
4. BALL B.V. (1985). Acute paralysis virus isolated from honey bee colonies infested with *Varroa jacobsoni*. *J. Apic. Res.*, **24**, 115–119.
5. BREM S. (1980). Laboruntersuchungen von Wintergemüll. In: Diagnose und Therapie der Varroatose. Apimondia Publishing House, Bucharest, Romania, 116–117.
6. DE JONG D. (1997). Varroa and other parasites of brood. In: Pests, Predators and Diseases of Honey Bees, Third Edition, Morse R.A., ed. A. I. Root, Medina, Ohio, USA, 231–279.
7. DE JONG D. & DE JONG P.H. (1983). Longevity of Africanized honey bees (*Hymenoptera Apidae*) infested by *Varroa jacobsoni* (Parasitiformes Varroidae). *J. Econ. Entomol.*, **76**, 766–768.
8. DE JONG P.H. & GONCALVES L.S. (1982). Weight loss and other damage to developing worker honey bees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *J. Apic. Res.*, **21**, 165–167.
9. FRIES I., CAMAZINE S. & SNEYD J. (1994). Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. *Bee World*, **75**, 4–28.
10. RITTER W. (1980). Varroatosis: A new disease of honey bee *Apis mellifera*. *Bee World*, **6**, 141–153.
11. RITTER W. (1996). Diagnostik und Bekämpfung der Bienenkrankheiten (Diagnosis and control of bee diseases). Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Germany.
12. RITTER W., LECLERQ E. & KOCH W. (1984). Observations des populations d'abeilles et de *Varroa* dans les colonies à différents niveaux d'infestation. *Apidologie*, **14**, 389–400.
13. SHIMANUKI H. & KNOX D.A. (1991). United States Department of Agriculture (USDA) Handbook No. 690. 53p.

*

* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour les maladies des abeilles (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

SECTION 2.3.

AVES

CHAPITRE 2.3.1.

CHLAMYDIOSE AVIAIRE

RÉSUMÉ

La chlamydiose aviaire (CA) est due à une bactérie nommée Chlamydophila psittaci. À l'origine, l'infection se produisant à la fois chez l'homme et chez les oiseaux a été appelée psittacose. Plus tard, le terme d'ornithose a été introduit pour distinguer la maladie contractée à partir ou se développant chez les oiseaux domestiques et le gibier d'eau, de la maladie contractée à partir ou se développant chez les psittacidés, la psittacose. Ces maladies sont similaires lorsqu'elles sont contractées par l'homme. Le genre Chlamydia a récemment été scindé en deux genres : Chlamydia et Chlamydophila. Toutes les souches aviaires appartiennent à l'espèce Chlamydophila psittaci. Le terme utilisé pour les maladies provoquées par les deux genres est chlamydiose. Au sein des souches aviaires, au moins 6 sérotypes ont été identifiés. Ceux-ci sont souvent associés à une espèce d'oiseaux. La chlamydiose qui se produit naturellement chez les mammifères et qui n'est pas contractée par les oiseaux est due à des souches différentes.

En fonction du sérovar de la souche et de l'hôte, Chlamydia est à l'origine de péricardites, conjonctivites, sinusites, aërosacculites, pneumonies, adénites nasales latérales, péritonites, hépatites et splénites. Les infections généralisées engendrent fièvre, anorexie, léthargie, diarrhée et, occasionnellement, un traumatisme voire la mort de l'individu. Les conséquences d'une infection chez l'homme étant sérieuses voir létales, il est recommandé de manipuler l'agent bactérien dans un laboratoire adapté. Une source identifiée de contaminations courantes pour l'homme est la manipulation et l'abattage de volailles malades (canards, dindes). Le diagnostic de CA nécessite l'isolement et l'identification de l'organisme, la mise en évidence de Chlamydia dans les tissus, ou la démonstration d'une élévation par quatre du titre en anticorps, associé à des signes cliniques typiques de la maladie.

Identification de l'agent pathogène : *l'isolement de Chlamydia nécessite l'inoculation d'œufs embryonnés de poule ou de cultures cellulaires, leur mise en évidence se faisant à l'aide de colorants cytochimiques ou de méthodes immunohistochimiques. Il est préférable d'inoculer directement les échantillons sur des cultures cellulaires car elles sont la plupart du temps aussi sensibles que les embryons de poule. Les cultures cellulaires sont ensuite, à des temps bien définis, traitées pour un marquage direct par immunofluorescence ou à l'aide de colorants appropriés afin de visualiser les inclusions.*

Des colorations histochimiques d'empreintes de foie, de cœur et de rate sont fréquemment réalisées. Ces techniques donnent rapidement un résultat mais elles nécessitent une certaine expérience.

Des épreuves immuno-enzymatiques (ELISA) développées pour la mise en évidence d'antigènes du trachome chez l'homme, ont été utilisées pour réaliser le diagnostic de la chlamydiose aviaire. Les premiers kits de diagnostic proposés reposaient sur l'utilisation d'un antisérum (monoclonal ou polyclonal) dirigé contre des épitopes du lipopolysaccharide. D'autres bactéries à Gram négatif partagent certains de ces épitopes. De ce fait, l'utilisation de ces tests ELISA pour le contrôle individuel des oiseaux est remise en cause par manque de sensibilité et de spécificité.

Les techniques moléculaires (polymorphisme de longueur des fragments de restriction après une amplification en chaîne par polymérase, micro-puces ADN ou séquençage) et la coloration immunohistochimique de coupes histologiques sont de nouvelles techniques qui semblent prometteuses pour le futur. Ces techniques sont rapides et ne nécessitent pas que le germe soit vivant. Les épreuves d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) usuelles ciblent le gène codant la MOMP ou les gènes ribosomaux (16S-23S) ; certaines permettent l'amplification de toutes les souches de *Chlamydia* ainsi que l'identification au niveau de l'espèce. Les PCR nichées ou en temps réel peuvent être aussi sensibles que l'isolement. Il y a eu une recrudescence de l'utilisation des colorations immunohistochimiques de coupes histologiques du fait du récent développement et de la disponibilité d'automates de coloration.

Épreuves sérologiques : l'épreuve sérologique de référence pour la mise en évidence des anticorps anti-*Chlamydia* est la technique de fixation du complément. La technique de FC directe modifiée convient à la plupart des sérums. L'antigène utilisé est composé de lipopolysaccharide, antigène présent chez toutes les souches de *Chlamydia*. La mise en évidence par cette technique d'un titre élevé chez la majorité des individus composant un groupe présentant des signes cliniques permet de suspecter une infection en cours.

D'autres épreuves sérologiques telles que les tests ELISA, les épreuves d'agglutination sur billes de latex ou des corps élémentaires, de micro-immunofluorescence et d'immunodiffusion en gélose sont disponibles. Ces épreuves présentent un intérêt dans des cas particuliers et pourraient remplacer à terme la technique de fixation du complément, toutefois des études comparant la fiabilité et la reproductibilité de ces épreuves ne sont pas encore disponibles.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : il n'y a pas de vaccin commercial disponible pour le contrôle de la chlamydiose chez les volailles. Les antibiotiques sont les seuls moyens de contrôle. *Chlamydophila psittaci* est sensible à de nombreux antibiotiques. Les molécules utilisées varient d'un pays à l'autre.

A. INTRODUCTION

La chlamydiose aviaire (CA) est provoquée par la bactérie *Chlamydophila psittaci*. La maladie chez les oiseaux a originellement été appelée psittacose, mais le terme d'ornithose a été introduit plus tard pour différencier la maladie chez les oiseaux domestiques et le gibier d'eau, de la maladie chez les psittacidés. Les deux syndromes sont actuellement considérés comme étant les mêmes (5). Leur distinction initiale a reposé sur le fait que chez les humains l'ornithose semblait être moins sévère que la psittacose. Cependant, il faut noter que la maladie contractée à partir de dindes ou de canards infectés est souvent aussi sévère que celle contractée à partir des psittacidés.

Chlamydophila psittaci génère, chez les oiseaux, une infection systémique, parfois fatale. Les signes cliniques varient beaucoup en termes de sévérité et dépendent de l'espèce, de l'âge des oiseaux et de la souche incriminée. La CA peut produire de la léthargie, de l'hyperthermie, des excréments anormaux, des écoulements nasaux et oculaires, et une baisse de production d'œufs. Les taux de mortalité peuvent varier grandement. Chez les oiseaux de compagnie, les signes cliniques les plus fréquents sont une conjonctivite, de l'anorexie, une perte de poids, de la diarrhée, des fientes jaunâtres, une sinusite, des urines vertes, un écoulement nasal, des éternuements, du larmolement et une détresse respiratoire (24). La plupart des oiseaux, et en particulier les psittacidés les plus âgés, peuvent ne pas présenter de signes cliniques ; néanmoins, ils peuvent souvent, excréter l'agent pendant de longues périodes. L'autopsie des oiseaux atteints révèle fréquemment une nécrose hépatique multifocale, une hypertrophie de la rate et du foie, une aérosacculite fibrineuse, une péricardite et une péritonite (5, 39, 40). Les lésions histologiques suggèrent l'infection mais ne sont pas pathognomoniques alors que *Chlamydia* est présente.

La famille *Chlamydiaceae* a été récemment scindée en deux genres et neuf espèces sur la base de l'analyse des séquences des gènes ribosomaux 16S et 23S (13). Les deux nouveaux genres, *Chlamydia* et *Chlamydophila*, correspondent aux anciennes espèces *Chlamydia trachomatis* et *C. psittaci*. Le genre *Chlamydia* comprend les espèces *C. trachomatis* (humain), *C. suis* (porc) et *C. muridarum* (souris et hamster). Le genre *Chlamydophila* comprend les espèces *C. psittaci* (aviaire), *C. felis* (chat), *C. abortus* (brebis, chèvre, bovins), *C. caviae* (cobaye) et l'ancienne espèce *C. pecorum* (ovin, bovin) et *C. pneumoniae* (humain).

Les deux genres et les neuf espèces ont des particularités à la fois moléculaires et de classification selon la gamme d'hôte et les signes cliniques. Les espèces montrent un fort degré de corrélation avec la gamme d'hôte, le syndrome de la maladie, la virulence et permet de comprendre l'épidémiologie de nombreuses espèces et sérovars affectant les troupeaux et les oiseaux. Les termes « chlamydiose » et « chlamydia(e) » sont utilisés

comme termes génériques pour les membres de chacun des deux genres. Toutefois, les nouveaux noms scientifiques sont utilisés quand il s'agit d'une espèce particulière de *Chlamydia*.

Toutes les souches aviaires appartiennent à l'espèce *Chlamydophila psittaci*. Cette espèce comprend 6 sérovars aviaires connus et deux sérovars mammifères : M56 isolée à partir de rats musqués et la souche WC isolée de bovins (13). Les souches M56 et WC ont chacune été isolées à la suite d'épidémies uniques. Les 6 sérovars aviaires sont identifiés de A à F et chacun présente une spécificité d'hôte. Les hôtes auxquels ces sérovars sont associés sont : A, psittacidés – B, pigeons – C, canards et oies – D, dindes – E, pigeons et ratites et F, un isolat unique à partir d'un psittacidé. Le nombre d'oiseaux et de mammifères hôtes naturels de ces sérovars est inconnu.

Les souches aviaires de *Chlamydia* peuvent infecter les humains et doivent être manipulées avec précautions sous des conditions de confinement biologique (31). La plupart des infections se produisent suite à l'inhalation d'aérosols infectieux. Les examens post-mortem des oiseaux infectés et la manipulation des cultures doivent être faits sous des hottes à flux laminaire ou avec des équipements de protection appropriés. Les infections humaines peuvent survenir suite à des expositions transitoires. La période d'incubation est généralement de 5 à 14 jours, toutefois, des périodes d'incubation plus longues sont possibles. Les infections chez l'homme varient d'une maladie inapparente à une maladie systémique sévère avec pneumonie interstitielle et encéphalite. La maladie est rarement fatale chez les patients traités de façon *ad hoc*. Toutefois la connaissance du danger et un diagnostic précoce sont importants. Les humains infectés développent typiquement des maux de tête, des frissons, des malaises et des myalgies, avec ou sans signes respiratoires. L'implication pulmonaire est fréquente, une auscultation peut donner lieu à un diagnostic normal ou à une sous-estimation de l'importance de la maladie. Le diagnostic peut être difficile et est généralement établi par la technique de fixation du complément, à partir de sérums appariés. Chez les humains, tétracycline, doxycycline ou azithromycine sont souvent des molécules de choix, sauf contre-indication. La durée du traitement varie en fonction de la molécule, mais les tétracyclines doivent être prescrites au moins pendant 14 jours.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

La méthode de choix pour l'identification de la chlamydiose aviaire est l'isolement et l'identification de l'organisme. En raison de la durée d'analyse, de la nécessité de disposer de prélèvements de haute qualité, et du risque d'exposition du personnel de laboratoire, d'autres techniques sont souvent utilisées. Celles-ci incluent la coloration histochemique de calques réalisés à partir d'exsudats, de fientes, ou de tissus, la coloration immunohistochemique ou cytologique de préparations histologiques, les épreuves immuno-enzymatiques (ELISA), l'amplification en chaîne par polymérase (PCR), la RFLP-PCR (polymorphisme de longueur des fragments de restriction [RFLP] après une amplification en chaîne par polymérase [PCR]), systèmes de détection et d'identification à base de micro-puces ADN ou le séquençage.

a) Collecte et traitement des échantillons

Les échantillons à collecter dépendent des signes de la maladie. Ils doivent être collectés aseptiquement. Les bactéries contaminantes peuvent interférer avec l'isolement de *Chlamydia*. Les prélèvements à faire en cas de signes aigus doivent inclure des exsudats inflammatoires ou fibrineux dans et autour des organes présentant des lésions, écoulements nasal et oculaire, empreintes de foie, sang total et tissus tels que rein, poumon, péricarde, rate et foie. En cas de diarrhée, le contenu intestinal et les fientes doivent être mis en culture. À partir d'oiseaux vivants, les prélèvements de choix sont les écouillons nasaux et pharyngés (2). Les fientes, les écouillons cloacaux, un raclage conjonctival et l'exsudat péritonéal peuvent aussi être collectés.

Une manipulation correcte des échantillons cliniques est nécessaire pour prévenir la perte d'infectivité de *Chlamydia* durant le transport et le stockage. Un milieu spécial de transport composé de sucrose/phosphate/glutamate (SPG) a été mis au point pour les rickettsiales et a été démontré satisfaisant pour le transport des échantillons de *Chlamydia* en provenance du terrain. Le milieu recommandé pour *Chlamydia* (32) est le milieu SPG composé de sucrose (74,6 g/litre) ; KH_2PO_4 (0,512 g/litre) ; K_2HPO_4 (1,237 g/litre) et acide glutamique L (0,721 g/litre), milieu qui peut être stérilisé par autoclavage ou par filtration. À ce milieu s'ajoute du sérum de veau fœtal (10 %), de la vancomycine, de la kanamycine et de la streptomycine (200 à 500 µg/ml), de l'amphotéricine B et de la gentamicine (50 µg/ml). L'ajout d'antibiotiques limite l'effet des contaminations, même lorsque les échantillons sont expédiés à température ambiante. Le milieu peut également être utilisé au laboratoire comme diluant et pour congeler les *Chlamydia*.

Les échantillons contaminés doivent être pré-traités avant d'être inoculés à des animaux ou sur des cultures cellulaires. Il y a 3 méthodes de base : traitement avec des antibiotiques (7, 8), traitement avec des antibiotiques associé à une centrifugation à vitesse lente (4, 5), et traitement avec des antibiotiques associé à une filtration (4, 7, 8). Un panel d'antibiotiques n'inhibant pas la multiplication de *Chlamydia* peut être utilisé. Les échantillons sont homogénéisés en tampon phosphate salin (PBS), pH 7,2, contenant : streptomycine (1 mg/ml), vancomycine (1 mg/ml) et kanamycine (1 mg/ml). La gentamycine peut être utilisée (200 µg/ml). L'amphotéricine B (50 µg/ml) peut être ajoutée pour contrôler la croissance des champignons et des levures. D'autres cocktails d'antibiotiques sont souvent utilisés. Pénicilline, tétracycline et chloramphénicol doivent être évités dans la mesure où ils inhibent la croissance de *Chlamydia*.

Lorsque la contamination est légère, les échantillons doivent être homogénéisés dans une solution contenant les antibiotiques avant de réaliser l'inoculation sur les embryons de poulet ou sur des cultures cellulaires. Les échantillons sont souvent laissés dans la suspension antibiotique pendant 24 h à 5 °C avant l'inoculation. Les échantillons fortement contaminés, tels que les fientes, doivent être homogénéisés dans la suspension d'antibiotiques, puis centrifugés à 500 *g* pendant 20 min. Le surnageant est alors inoculé. Les échantillons doivent être filtrés sur des filtres 450 à 800 µm si la contamination persiste.

b) Isolement par culture cellulaire

Les cultures cellulaires sont les méthodes les plus pratiques pour l'isolement de *C. psittaci*. Les lignées cellulaires sont satisfaisantes, les plus utilisées sont buffalo green monkey (BGM), McCoy, HeLa, African green monkey kidney (Vero) et cellules L (38). Les cellules se multiplient en monocouche, un milieu de culture classique pour les tissus est utilisé additionné de 5 à 10 % de sérum de veau fœtal et d'un cocktail d'antibiotiques n'inhibant pas la multiplication de *Chlamydia* (voir précédemment).

Au moment de choisir l'équipement pour la culture cellulaire, il est important de se souvenir que :

- i) *Chlamydia* peut être identifiée par des techniques d'immunofluorescence directes ou indirectes ou par une autre technique de coloration appropriée ;
- ii) L'inoculum est généralement centrifugé sur le tapis cellulaire afin d'augmenter son infectivité ;
- iii) Les échantillons peuvent nécessiter d'être repassés en passage aveugle après 4 à 5 jours pour augmenter la sensibilité de l'isolement ;
- iv) Les échantillons devront être examinés 2 à 3 fois durant chaque passage, et
- v) *Chlamydia* présente un risque infectieux pour l'homme.

Des petites flasques à fond plat, telles que les tubes bijoux (3,7 ml, 15 × 45 mm) ou des flacons équipés de couvercles glissants de 12 mm de diamètre peuvent remplir ces conditions (7, 8). Généralement 4 à 6 tubes sont inoculés avec l'échantillon afin de pouvoir fixer et colorer à différents temps d'incubation, mais aussi afin de pouvoir repasser l'échantillon apparemment négatif après 6 jours d'inoculation. Lorsque plusieurs échantillons sont testés, des plaques de 96 puits peuvent être utilisées. Toutefois, des contaminations croisées entre les échantillons peuvent poser un problème.

Chlamydia peut être isolée à partir de cellules se répliquant normalement, mais l'utilisation de cellules non répliquantes est préférable fournissant ainsi à *Chlamydia* plus de nutriments pour sa croissance. Des cellules suppressives peuvent aussi être observées sur de longues périodes. La division cellulaire peut être stoppée soit par irradiation, ou plus communément par ajout de molécules cytotoxiques. Celles-ci peuvent être de la 5-iodo-2-deoxyuridine, de la cyto-cholasine B, de la cycloheximide, et de l'émétine hydrochloride (27). La cycloheximide est la molécule la plus couramment utilisée et peut être ajoutée au milieu de culture à la concentration de 0,5 à 2,0 µg/ml au moment de l'inoculation du tapis cellulaire. L'émétine est éliminée après le traitement et remplacée par du milieu frais (4, 5, 7, 8). Le tapis cellulaire est d'abord traité pendant 5 min avec l'émétine (0,5 µg/ml) après quoi l'émétine est éliminée pour être remplacée par du milieu de culture, le tapis cellulaire est alors prêt à l'emploi. La croissance de la plupart des souches de *Chlamydia* sera augmentée par le traitement des tapis cellulaires par l'une de ces molécules, le traitement n'aura pas ou peu d'effet sur la croissance des souches.

L'attachement de *Chlamydia* aux cellules est facilité par une centrifugation de l'inoculum sur le tapis cellulaire à 500-1 500 *g* pendant 30 à 90 min à 37 °C. L'inoculum est éliminé et remplacé par du milieu de culture pour tissus contenant un inhibiteur de la division cellulaire, puis incubé entre 37 et 39 °C. Pour la mise en évidence de *Chlamydia*, les cultures doivent être examinées à intervalles réguliers en utilisant une méthode de coloration appropriée. Cela est généralement fait 2 à 3 jours après l'inoculation ainsi que 4 à 5 jours après l'inoculation. Les cultures négatives au 5^e jour sont récoltées et ré-inoculées. Quand un passage est envisagé, la suspension collectée doit être ré-inoculée sur un autre tapis cellulaire sans étape de congélation préalable. L'étape de congélation-décongélation ne devant pas être utilisée pour casser les cellules car cela détruit aussi *Chlamydia*.

Avant de colorer les tapis cellulaires, le milieu de culture est éliminé, le tapis cellulaire est lavé avec du PBS et fixé avec de l'acétone pendant 2 à 10 min. Le temps de fixation dépendra du support utilisé pour la culture cellulaire. L'acétone ramollissant les plastiques, un mélange à parties égales d'acétone et d'alcool méthylique est préférable. Plusieurs méthodes de coloration peuvent être utilisées pour mettre en évidence les inclusions. La méthode de choix est la technique d'immunofluorescence directe (4, 7, 25). Un sérum anti-*Chlamydia* conjugué à la fluorescéine est incubé avec les cellules infectées en chambre humide pendant 30 min à 37 °C. Après trois lavages en PBS, le tapis cellulaire est séché, monté et examiné. Les inclusions fluorescentes en vert. Des préparations commerciales d'anticorps monoclonaux (AcM) sont disponibles et fortement spécifiques. Des conjugués peuvent être préparés à partir de sérums polyclonaux, mais il est important d'obtenir un anti-sérum spécifique et de titre élevé. Des anti-sérums polyclonaux peuvent être préparés chez les lapins, les cochons d'Inde, le mouton ou la chèvre. Le mouton et la chèvre sont un bon modèle car des volumes et des titres élevés d'anticorps sont facilement obtenus après une infection. Les conjugués sont alors préparés en utilisant les techniques classiques (4, 5, 7).

Les inclusions peuvent aussi être mises en évidence par des techniques indirectes reposant sur l'utilisation d'anticorps fluorescents et d'une immunoperoxidase (4, 6, 25). La coloration directe peut être faite avec des colorants tels que ceux de Gimenez, de Giemsa, de Ziehl-Neelsen ou de Macchiavello. Hormis l'immunofluorescence, tous ces colorants ont l'avantage de ne nécessiter qu'un microscope optique.

c) Isolement sur œufs

Les embryons de poule sont également utilisés pour l'isolement primaire de *Chlamydia*. La procédure consiste à injecter jusqu'à 0,5 ml d'inoculum dans le sac vitellin d'un embryon de 6 à 7 jours indemne d'agents pathogènes spécifiques (4, 5). Les œufs sont ensuite incubés en atmosphère humide à 39 °C plutôt qu'à 37 °C, la multiplication de *Chlamydia* est fortement augmentée à température élevée. La multiplication de l'organisme provoque généralement la mort de l'embryon sous 3 à 10 jours. Si l'embryon ne meurt pas, deux passages aveugles sont généralement effectués avant de le considérer comme négatif. Les infections à *Chlamydia* génèrent une congestion vasculaire typique de la membrane vitelline. Celle-ci est prélevée et homogénéisée avec du tampon SPG à 20 % (poids/vol), et peut être congelée pour conserver la souche, ou inoculée sur œufs ou sur lignées cellulaires.

L'organisme peut être identifié en préparant l'antigène à partir d'une membrane vitelline infectée et en le testant par coloration directe de calques en utilisant des colorants appropriés ou en utilisant l'antigène dans une épreuve sérologique. Les cultures cellulaires monocouches peuvent être inoculées avec une suspension de membrane vitelline et examinée par immunofluorescence directe 48 à 72 h plus tard pour mettre en évidence *Chlamydia*. Les inclusions typiques sont intracytoplasmiques, rondes ou coiffées. Pour certaines souches virulentes, les inclusions éclatent rapidement, libérant des antigènes un peu partout dans le cytoplasme.

d) Différenciation espèces/souches

Tous les isolats aviaires appartiennent au groupe *Chlamydophila psittaci*, comme précisé ci-dessus (13). Les souches aviaires peuvent être différenciées des autres *Chlamydia* par PCR-RFLP du gène codant la protéine MOMP ou de l'opéron 16S-23S ADNr (12). Une technologie à base de micro-puces ADN a été développée récemment pour différencier entre les souches de *Chlamydia* (29). Un typage provisoire peut être établi en fonction de la source de l'isolat et à partir d'anticorps monoclonaux spécifiques du sérovar.

Les souches aviaires de *C. psittaci* comptent au moins 6 sérotypes déterminés à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de sérovar (1, 3, 6). Les syndromes provoqués par les diverses souches sont assez spécifiques ; l'éventail des hôtes naturels de ces souches particulières peut aussi être assez spécifique. Les sérotypes sont nommés A à F. Les hôtes à partir desquels ils sont principalement isolés sont : sérotype A, psittacidés ; sérotype B, pigeons ; sérotype C, canards ; sérotype D, dindes ; sérotype E, pigeons et ratites ; et un isolat appartenant au sérotype F à partir d'un psittacidé.

Les souches aviaires peuvent être différenciées par des techniques moléculaires telles que la PCR-RFLP (3, 30, 37). Le sérotypage et la PCR-RFLP ont été comparés (33, 35) et il arrive parfois que des résultats discordants soient observés. Un nouveau génotype, dénommé E/B, a été récemment identifié ; son séquençage a clairement démontré que de nouveaux génotypes ne peuvent pas toujours être découverts par la PCR-RFLP ou le sérotypage.

e) Coloration histochimique

Les colorations de Giemsa, Gimenez, Ziehl-Neelsen et Macchiavello sont les plus couramment utilisées pour la mise en évidence de *Chlamydia* à partir de calques de foie ou de rate. La technique modifiée de Gimenez décrite ci-dessous est utilisée par plusieurs laboratoires (4).

- **Technique modifiée de Gimenez ou coloration de Pierce-van der Kamp**

- **Réactifs :**

Solution 1 : Eau distillée (450,0 ml) et phénol (5,0 ml) additionnés de fuchsine basique (2,5 g) et 50,0 ml d'éthanol 95 %. Incuber la solution à 37 °C pendant 48 h. Filtrer et stocker à l'abri de la lumière, à température ambiante.

Solution 2 : Na₂HPO₄ (11,65 g) ; Na₂HPO₄.H₂O (2,47 g) ; eau distillée, pH 7,5 (jusqu'à 1 litre).

Solution 3 : Solution 1 (20,0 ml) et Solution 2 (25,0 ml). Laisser reposer 10 min, filtrer et utiliser.

Solution 4 : Acide citrique 0,5 %.

Solution 5 : Vert malachite (0,2 g), eau distillée (100,0 ml) et acide acétique glacial (0,2 ml).

Solution 6 : Solution 5 (20,0 ml) et eau distillée (50,0 ml).

- **Procédure pour la réalisation des calques :**

- Fixer le calque au méthanol pendant 5 min ;
- Colorer en Solution 3 pendant 10 min et rincer à l'eau courante ;
- Contre-colorer en Solution 6 pendant 2 min ;
- Rincer en eau courante et sécher à l'air.

- **Procédure pour les coupes en paraffine :**

- Déparaffiner et hydrater les coupes en eau distillée ;
- Colorer en Solution 3 pendant 10 min et rincer à l'eau courante ;
- Tremper en Solution 4 jusqu'à ce qu'aucune traînée rouge ne se forme, rincer en eau courante ;
- Contre-colorer en Solution 6 pendant 20 immersions ;
- Plonger 5 fois dans 2 flacons d'alcool 95 %. Déshydrater, éclaircir et monter.

Les *Chlamydia* apparaîtront en rouge sur un fond vert.

f) Coloration immunohistochimique

Les colorations immunohistochimiques peuvent être utilisées pour détecter *Chlamydia* dans les préparations cytologiques et histologiques. La technique est plus sensible que la coloration histochemique, mais l'expérience est nécessaire, des réactions croisées avec certaines bactéries ou champignons nécessitant la prise en compte de la morphologie.

Plus largement utilisés, les protocoles de coloration immunohistochimique peuvent être adaptés pour donner des résultats satisfaisants. Le choix de l'anticorps primaire est essentiel. Des anticorps monoclonaux et polyclonaux ont été utilisés. Etant donné que le formol altère les antigènes, il est recommandé de n'utiliser que des anticorps polyclonaux produits à partir de *Chlamydia* inactivées au formol. La souche utilisée n'a pas d'importance étant donné que les anticorps produits seront principalement dirigés contre des antigènes de groupe. Les AcMs devront aussi être sélectionnés pour leur réactivité envers des *Chlamydia* fixées au formol. Un ensemble d'AcMs dirigés contre le groupe peuvent être utilisés.

g) Épreuve immuno-enzymatique (ELISA)

L'ELISA est une technique relativement récente qui a beaucoup été utilisée pour le diagnostic de la chlamydiose humaine. Les kits de diagnostic détectent le lipopolysaccharide (LPS), un antigène de groupe et permettent de détecter toutes les espèces de *Chlamydia*. Certains de ces kits de diagnostic ont été utilisés pour la détection de la chlamydiose aviaire (41), mais aucun n'est agréé pour la détection de *C. psittaci*. Un des problèmes liés à certaines de ces kits est que le LPS des *Chlamydia* partage des épitopes avec d'autres bactéries à Gram négatif, générant un nombre élevé de résultats faussement positifs. Ce problème a été réduit, voire éliminé dans les kits de diagnostic récemment développés par une sélection fine des anticorps monoclonaux utilisés. Ces kits toutefois manquent encore de sensibilité, une centaine d'organismes sont encore nécessaires pour générer une réaction positive ; la plupart des praticiens pensent

que le diagnostic d'une chlamydiose aviaire peut être fait lorsqu'une forte réponse sérologique en ELISA est obtenue à partir d'oiseaux présentant des signes cliniques de psittacose. En raison des nombreux résultats faussement positifs, un résultat positif pour un individu ne présentant pas de signes de la maladie, n'est pas considéré comme significatif, mais indique la nécessité d'une investigation par d'autres méthodes.

h) Amplification en chaîne par polymérase (PCR) et systèmes basés sur la PCR

Les techniques de PCR sont en train de remplacer l'isolement pour la détection de *Chlamydia* chez les animaux. La sensibilité et la spécificité sont égales voire supérieures à celles de l'isolement, et les échantillons peuvent être inactivés avant la réaction. Les PCR courantes pour la détection de *C. psittaci* ciblent le gène codant la protéine MOMP ou le gène 16S-23S (14-16, 22, 23, 28, 34, 36). La sensibilité et la spécificité de cette technique varient en fonction de la méthode de préparation de l'échantillon et de l'épreuve PCR mise en œuvre. Les réactifs utilisés en vue de stabiliser l'ADN doivent être choisis en tenant compte du délai avant l'exécution de la réaction (11). Les échantillons d'ADN peuvent être préparés en utilisant des réactifs peu coûteux ou en utilisant les kits de diagnostic disponibles dans le commerce (4). La sensibilité est augmentée en ciblant une séquence d'ADN relativement courte, en utilisant une technique de PCR nichée ou une technique de PCR en temps réel. La PCR nichée équivaut à l'isolement en terme de sensibilité et spécificité. Cependant, le risque de contaminations augmente si les plus grandes précautions ne sont pas prises lors de la manipulation (voir Chapitre 1.1.5., « Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses » de ce *Manuel terrestre*). D'excellents protocoles de PCR nichée sont disponibles (23, 28, 36). La PCR en temps réel nécessite une sonde marquée et un équipement spécial qui augmentent les coûts. Sa sensibilité est proche de celle de la PCR nichée et les problèmes de contamination sont réduits puisqu'elle consiste en une seule réaction en système clos (14-16). Le fait de cibler le gène 16S-23S permet aussi d'augmenter la sensibilité, des multicopies étant généralement présentes dans l'organisme, toutefois des réactions croisées avec d'autres bactéries peuvent être un problème. Le séquençage des produits de PCR permet une comparaison avec les séquences des souches aviaires de référence et la séquence peut être utilisée pour des analyses phylogénétiques pour de la classification ou à des fins épidémiologiques.

La technologie des micro-puces à ADN a été récemment mise au point pour la détection des chlamydias (29). L'épreuve s'est aussi révélée pratique pour l'identification des espèces de *Chlamydia* dans les cultures cellulaires et elle pourrait potentiellement servir dans le diagnostic direct de ces bactéries à partir d'échantillons cliniques tissulaires.

2. Épreuves sérologiques

a) La technique modifiée de fixation directe du complément pour *Chlamydia*

La méthode décrite ci-dessous est la technique modifiée, très largement utilisée, de fixation du complément (FC) directe pour la détection des anticorps. Les réactifs sont relativement faciles à préparer et à normaliser. Il y a d'autres tests de FC, chacun ayant ses avantages. La technique modifiée de FC directe est réalisée en plaque P96. Les étapes d'incubation sont généralement faites en bain-marie à 37 °C. L'antigène de *Chlamydia* utilisé peut être préparé soit à partir de membranes vitellines ou à partir de cultures cellulaires. La technique modifiée de FC directe diffère de la technique classique de FC directe, dans le sens où un sérum de poulet non chauffé issu d'un poulet sans anticorps anti-*Chlamydia* est ajouté à la dilution du complément. Le sérum normal ajouté augmente la sensibilité de la technique de FC, dès lors il peut être utilisé pour tester un sérum issu d'une espèce aviaire dont les anticorps ne fixent pas normalement le complément de cobaye.

- **Protocole**

- i) *Dilution des sérums*

La figure 1 donne un schéma possible pour la réalisation du test sur des plaques P96 à fond rond. Tous les sérums doivent être inactivés à 60 °C pendant 30 min avant utilisation. Le sérum est dilué en tampon véronal comme montré dans la figure 1. Les dilutions sont faites en plaque en ajoutant 100 µl de tampon véronal à chacun des puits des lignes A et E, puis en ajoutant 25 µl de sérum non dilué, de sérum positif ou de sérum négatif à chacun des 3 puits. Cela donne une dilution de départ au 1/5. Ensuite 25 µl de tampon véronal sont ajoutés à chacun des puits des lignes B à D, et des lignes F à H. Des dilutions au 1/2 sont réalisées, en utilisant une micropipette de 25 µl, de la ligne A à la ligne D et de la ligne E à la ligne H. Des volumes appropriés sont éliminés à partir des lignes de départ et d'arrivée afin d'avoir au final 25 µl par puits. Le diluteur est rincé deux fois en eau distillée et une fois en tampon véronal entre chaque sérum.

Dilutions des sérums	Sérum #1			Sérum #2			Sérum #3			Sérum #4		
	Antigènes: +Ag TpV -Ag			+Ag TpV -Ag			+Ag TpV -Ag			+Ag TpV -Ag		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/5	A											
1/10	B											
1/20	C											
1/40	D											
1/5	E											
1/10	F											
1/20	G											
1/40	H											
	Sérum #5			Sérum #6			+ Contrôle			- Contrôle		

Fig. 1. Suggestion de schéma pour la technique modifiée de FC directe en plaque à 96 puits.

ii) *Ajout de l'antigène*

À chacun des puits, en colonne 1, 4, 7 et 10, ajouter 25 µl d'antigène de *Chlamydia*. Dans les colonnes 2, 5, 8 et 11, ajouter 25 µl de tampon véronal (puits témoin anti-complémentaire), et dans les colonnes 3, 6, 9 et 12, ajouter 25 µl d'antigène négatif (membrane vitelline ou culture cellulaire préparée de la même façon que l'antigène de *Chlamydia*). Les antigènes de *Chlamydia* sont stockés non dilués à 4 °C et dilués à la concentration *ad hoc* en tampon véronal avant utilisation.

iii) *Ajout du complément*

Le complément (C') est stocké à -70 °C et doit être décongelé et dilué en tampon véronal avant d'être ajouté à l'antigène. Du sérum frais de poulet est ajouté avant la dilution du C' afin d'être à une concentration de 5 % finale. Les dilutions du C' sont faites comme dans les précédents tests ou à partir des titrages. Le C' doit être mis dans un bain de glace pendant 15 min pour qu'il se stabilise. Le C' dilué doit être stocké à 4 °C après sa stabilisation et doit être utilisé dans les 2 heures. 50 µl de C' est ajouté à chacun des puits immédiatement après l'ajout des antigènes. Les plaques non couvertes sont incubées à 37 °C en bain-marie pendant 2 h.

iv) *Addition des hématies de mouton*

Mélanger une suspension normalisée d'hématies à 4 % à un volume égal de tampon véronal. A ce volume, ajouter un volume égal d'hémolysine diluée en tampon véronal. La dilution finale est incubée à 37 °C en bain-marie pendant 15 min afin de sensibiliser les hématies. Dans chaque puits, ajouter 50 µl d'hématies sensibilisées. Les plaques sont alors incubées pendant 1 h à 37 °C au bain-marie. Les plaques sont ensuite centrifugées à 400 g pendant 5 min avant d'être lues ou elles peuvent être mises à 4 °C pour la nuit avant lecture.

v) *Interprétation des résultats*

Les puits sont souvent notés 1+, 2+, 3+ ou 4+ correspondant, respectivement, à la réduction de l'hémolyse à 25, 50, 75 ou 100 %. Une réaction positive est 2+ ou plus, ce qui correspond à 50 % ou moins d'hémolyse des globules rouges. Cela signifie que le complément s'est fixé à l'anticorps avant que les globules rouges n'aient été ajoutés. Les puits négatifs sont repérés alors qu'il y a lyse complète des cellules, le complément restant, non lié, a réagi avec les globules rouges et le sérum hémolytique a lysé les globules rouges.

Le test est ininterprétable lorsque le sérum est anti-complémentaire et qu'une réaction positive est observée dans la dilution du sérum en tampon véronal comme antigène. Des réactions non spécifiques donnent des réactions positives à la fois dans les puits négatifs et dans les puits positifs.

- **Réactifs**

- i) **Préparation de l'antigène**

La méthode la plus simple consiste à multiplier les *Chlamydia* par culture cellulaire. Les deux méthodes décrites ci-dessous génèrent des antigènes qui peuvent être utilisés dans la technique de micro-FC. Les deux procédures sont assez similaires, toutes deux incluent la croissance des *Chlamydia* en culture cellulaire, leur inactivation, une purification partielle de l'antigène, une lyse mécanique et une dilution dans un tampon approprié. La méthode sélectionnée dépendra de l'équipement disponible.

La première méthode (17, 19) commence par la collecte des *Chlamydia* et des débris cellulaires lorsque l'effet cytopathogène est observé. La suspension est inactivée par ajout de phénol à la concentration finale de 1,0 % pendant 24 h à 37 °C puis concentrée par centrifugation à 10 000 *g* pendant 1 h. Le culot est reconstitué à 10 % de son volume initial en tampon véronal pH 7,2 contenant 1,0 % de phénol et 1,0 % de glycérol.

La suspension est homogénéisée 3 fois 1 min dans un omnimixer à la vitesse maximale sur glace artificielle. La suspension est centrifugée 15 min à 100 *g* afin d'éliminer les débris. Certains protocoles suggèrent de chauffer l'antigène pendant 30 min dans un bain d'eau bouillonnante. Le surnageant est récupéré et dilué à la concentration désirée.

Dans la seconde procédure, pour la production de l'antigène pour la technique de FC (9, 10), l'antigène est préparé à partir de cellules L infectées avec une souche de psittacidés. Le milieu de culture cellulaire est éliminé, et les cellules sont chauffées 40 min à 56 °C. Les cellules sont lysées en eau distillée et les *Chlamydia* sont lysées par ultra-sonication et reprises en tampon véronal. L'antigène est testé vis-à-vis d'un sérum de référence de brebis convalescente et utilisé à 2 unités en test de micro-FC.

Il existe de nombreux protocoles pour la préparation d'antigènes à partir de membranes vitellines, certaines étant très élaborées. Toutefois, à partir de la procédure décrite ci-après, il est relativement facile de préparer un antigène brut à partir de membranes vitellines, antigène fonctionnant bien dans la technique directe modifiée de FC. Une souche de *Chlamydia* adaptée aux œufs est utilisée pour inoculer des œufs embryonnés de poule âgés de 6 à 7 jours via le sac vitellin. Les membranes vitellines sont récoltées à partir des embryons morts entre le 3^e et le 7^e jour suivant l'inoculation. La membrane vitelline récoltée est diluée au 1/3 en PBS, en tampon Tris ou en milieu de culture, puis autoclavée pendant 20 min. La suspension est ensuite refroidie et homogénéisée. L'utilisation d'un homogénéisateur de tissus à haute vitesse pendant 3 à 5 min est recommandée. Après l'homogénéisation, le phénol est ajouté à la concentration finale de 0,5 % (préparer un stock de solution de phénol à 5 %, et ajouter 1 ml à chaque 9 ml d'antigène). La préparation antigénique est préparée, conservée 3 jours, et le surnageant est utilisé après centrifugation pendant 20 min à 1 000 *g*. L'antigène peut ainsi être conservé pendant une longue période à 4 °C.

- ii) **Préparation des globules rouges sensibilisés**

La défibrination des globules rouges est préservée en les mélangeant à un volume égal de solution Alsever. Ils peuvent ainsi être stockés à 4 °C jusqu'à 4 semaines. Laver 25 ml de globules rouges avec 25 ml de tampon véronal. Centrifuger à 400 *g* pendant 10 min. Aspirer le tampon véronal et re-suspendre le culot avec 50 ml de tampon véronal. Répéter le lavage pour un total de 3 fois. Après les étapes de lavage, 2,2 ml de globules sont dilués avec 98 ml de tampon véronal. Les globules rouges peuvent être normalisés par densité optique : mélanger 1 ml de globules rouges dilués et lavés avec 14 ml d'eau distillée, déterminer l'absorbance en utilisant un spectrophotomètre et normaliser la suspension à 0,25 à la longueur d'onde de 550 nm. La valeur lue peut être utilisée dans la formule suivante afin de déterminer la dilution à effectuer :

$$\text{Volume final de globules rouges} = \frac{(\text{absorbance lue} \times \text{volume actuel})}{0,25 \text{ absorbance désirée}}$$

Les globules rouges sont sensibilisés par ajout d'un volume égal de tampon véronal contenant la dilution appropriée d'hémolysine (dilution déterminée par titrage). Incuber à 37 °C pendant 15 min avant utilisation.

- iii) **Tampon véronal**

Le tampon véronal est préparé en solution stock × 5 qui est diluée au 1/5 en eau distillée avant utilisation. La formule suivante permet de produire 4 litres. A de l'eau distillée ajouter du sodium

barbital (7,5 g), barbital H₂O (dissoudre en eau bouillante) (11,5 g), MgSO₄·7 H₂O (4,056 g), NaCl (170,0 g) et CaCl₂ (0,078 g). Ajouter de l'eau distillée jusqu'à 4 litres.

iv) *Titration du complément*

Le complément (C') est instable et se dégrade s'il n'est pas manipulé correctement. Normalement, il doit être congelé à -70 °C en parties aliquotes utilisées une seule fois afin de ne pas être recongelées. Afin d'obtenir la concentration de travail désirée (2 unités par puits), ajouter en premier 5 % de sérum de poulet afin d'augmenter la sensibilité du test comme décrit précédemment. Ensuite, estimer le point de départ à partir des lots précédents. Un bon point de départ est la dilution au 1/30 une fois le sérum de poulet ajouté. Préparer une série de tubes avec des quantités variables de complément en tampon véronal. Le tampon véronal doit contenir l'antigène qui sera utilisé dans la réaction et devra prendre en compte toute propriété anti-complémentaire de l'antigène. Une méthode classique consiste à diluer 0,10 ml de C' avec 0,90 ml de tampon véronal ; 0,12 ml de C' avec 0,88 ml de tampon véronal, etc. jusqu'à 0,25 ml de C' avec 0,75 ml de tampon véronal. Incuber les tubes pendant 2 h à 37 °C en bain-marie. Ajouter 0,5 ml de globules rouges sensibilisés à chacun des tubes. Incuber 1 h de plus à 37 °C en bain-marie. La plus forte dilution donnant une hémolyse totale équivaut à 1 unité. Une double quantité équivaut à 2 unités. La formule suivante peut être utilisée pour obtenir 2 unités/0,05 ml :

$$x = (di) (v)/2dh$$

Où :

x = inverse de la dilution du C' donnant 2 unités C'/puits
 di = inverse de la dilution initiale du C' utilisée lors du titrage (1/30)
 v = volume du C' dilué à ajouter
 dh = double du volume de C' donnant une hémolyse totale lors du titrage

v) *Titration de l'hémolysine*

L'hémolysine peut être achetée dans le commerce. Elle doit être normalisée par titrage. La méthode suivante est recommandée :

Préparer une dilution au 1/100 de la solution stock d'hémolysine en tampon véronal. À partir de cette suspension, préparer, en tube, les dilutions 1/300, 1/400 et 1/500. À partir de ces dilutions, préparer 0,5 ml de dilutions en double en tampon véronal pour le titrage.

Afin de déterminer la concentration d'hémolysine, ajouter à chacun des 0,5 ml des dilutions : 0,5 ml de C' dilué au 1/30, 0,5 ml de globules rouges non sensibilisés à la densité optique de 0,25 et 1,5 ml de tampon véronal. Incuber pendant 1 h à 37 °C puis centrifuger à 400 *g* pendant 5 min. Une unité d'hémolysine correspond à la dilution qui donne une lyse complète des globules rouges. La solution d'hémolysine est préparée en tampon véronal à la dilution contenant 2 unités. Celle-ci est ensuite ajoutée à un volume égal de globules rouges à concentration *ad hoc*.

vi) *Titration de l'antigène et du sérum témoin positif*

Afin de normaliser le test de FC, il est aussi nécessaire d'attribuer un titre à la fois à l'antigène et au sérum témoin positif. Si le titre du sérum positif ou de l'antigène est connu, le titre de l'autre composant peut être déterminé en réalisant le test de FC en réalisant des dilutions du composant à titrer. Si le titre de ces deux composants est inconnu, un titrage en échiquier peut être réalisé pour déterminer les dilutions limites des deux composants à partir de laquelle l'hémolyse démarre. Il est très difficile de déterminer ces titres précisément.

À la fois pour l'antigène et pour le sérum témoin positif, 4 unités sont utilisées. Une unité correspond à la dilution la plus élevée qui donne un test positif. De ce fait, si une dilution au 1/160 donne un test positif, alors une dilution 1/40 correspondant à 4 unités est utilisée pour le test.

Les anticorps fixant le complément apparaissent généralement 7 à 10 jours après l'infection. Pour un diagnostic positif, une augmentation par 4 du titre en anticorps par la technique de fixation du complément est requise. Un diagnostic de présomption réalisé sur la base d'épreuves sérologiques dans un troupeau peut seulement être fait si des signes typiques cliniques sont observés et si une majorité des oiseaux a un titre en anticorps supérieur à 1/64.

b) Autres épreuves

D'autres épreuves sérologiques ont été développées, mais leur spécificité n'a pas été suffisamment évaluée. Un ELISA détectant des anticorps spécifiques de groupe est plus rapide et plus sensible que le test de FC, il peut être automatisé. Les évaluations faites sur les ELISA détectant à la fois les anticorps dirigés contre *C. trachomatis* et *C. psittaci* indiquent que ces tests sont très sensibles mais qu'ils manquent de spécificité. De nouveaux tests utilisant des peptides ou des antigènes recombinés sont en cours de développement et pourraient résoudre les problèmes de spécificité.

Les autres épreuves comprennent l'épreuve d'immunodiffusion en gélose (26), l'agglutination sur latex, l'agglutination des corps élémentaires (18, 21) et le test de micro-immunofluorescence. L'immunodiffusion est moins sensible que le test de FC. L'agglutination sur latex pourrait détecter des anticorps anti-*C. psittaci* et elle est facile et rapide à réaliser (20). Les billes de latex sont recouvertes avec des antigènes de *Chlamydia* purifiées, mixées avec le sérum à analyser sur une plaque de verre et agitées par rotation pendant 2 min afin d'augmenter l'agglutination. La réaction est lue sur un fond foncé. Les sérums donnant des réactions positives doivent être re-testés avec des billes non recouvertes d'antigènes afin d'éliminer les possibles agglutinations non-spécifiques. Le test d'agglutination au latex et la technique de fixation du complément corrélerent à 72,5 % sur des sérums appariés. Le test d'agglutination au latex a une sensibilité de 39,1 % et une spécificité de 98,8 % par rapport à la technique de FC directe (20). Le test détecte à la fois les IgM et les IgG, mais détecte mieux les IgM. Ce test a été proposé pour détecter les infections récentes ou actives. Le test d'agglutination des corps élémentaires détecte uniquement les IgM et est indicateur d'une infection en cours. L'épreuve de micro-immunofluorescence est rapide et facile à réaliser, cependant les conjugués spécifiques d'espèce couplés à la fluorescéine ne sont pas toujours disponibles.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'y a pas de vaccins commercialisés pour la chlamydiose en élevage avicole. Les essais de production de vaccins ont rencontré un succès limité et la plupart du temps reposaient sur des suspensions produites à partir de *Chlamydia* inactivées au formol. Il existe des preuves comme quoi l'immunité implique une réponse immunitaire cellulaire (30, 31), mais les vaccins produits ne s'adressent pas à ce type de réponse.

Les antibiotiques sont les seuls moyens actuels de contrôle. *Chlamydophila psittaci* est sensible à un certain nombre d'antibiotiques ; la molécule de choix variant d'un pays à l'autre. Chlortétracycline, doxycycline et autres tétracyclines sont les molécules les plus couramment utilisées. Les fluoroquinolones ont également montré leur efficacité (25). Pour être efficace, le traitement doit être maintenu pendant une longue période. Pour les oiseaux de compagnie, 45 jours de traitement sont le plus souvent recommandés (31, 39).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANDERSEN A.A. (1991). Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the micro-immunofluorescence test. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 707–711.
2. ANDERSEN A.A. (1996). Comparison of pharyngeal, fecal, and cloacal samples for the isolation of *Chlamydia psittaci* from experimentally infected cockatiels and turkeys. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 448–450.
3. ANDERSEN A.A. (1997). Two new serovars of *Chlamydia psittaci* from North American birds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 159–164.
4. ANDERSEN A.A. & VANROMPAY D. (2005). Chlamydiosis. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fifth Edition. Submitted USA.
5. ANDERSEN A.A. & VANROMPAY D. (2003). Avian Chlamydiosis (Psittacosis, Ornithosis). In: Diseases of Poultry, Eleventh Edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 863–879.
6. ANDERSEN A.A. & VAN DUSEN R.A. (1988). Production and partial characterization of monoclonal antibodies to four *Chlamydia psittaci* isolates. *Infect. Immun.*, **56**, 2075–2079.
7. BEVAN B.J. & BRACEWELL C.D. (1986). Chlamydiosis in birds in Great Britain. 2. Isolations of *Chlamydia psittaci* from birds sampled between 1976 and 1984. *J. Hyg. (Camb.)*, **96**, 453–458.

8. BEVAN B.J., CULLEN G.A. & READ W.M.F. (1978). Isolation of *Chlamydia psittaci* from avian sources using growth in cell culture. *Avian Pathol.*, **7**, 203–211.
9. BRACEWELL C.D. & BEVAN B.J. (1982). *Chlamydia* infections in ducks: Preliminary communication. *J. R. Soc. Med.*, **75**, 249–252.
10. BRACEWELL C.D. & BEVAN B.J. (1986). Chlamydiosis in birds in Great Britain. 1. Serological reactions to chlamydia in birds sampled between 1974 and 1983. *J. Hyg. (Camb.)*, **96**, 447–451.
11. DEGRAVES F.J., GAO D. & KALTENBOECK B. (2003). High-sensitivity quantitative PCR platform. *Biotechniques*, **34** (1):106–110, 112–115.
12. EVERETT K.D.E. & ANDERSEN A.A. (1999). Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 803–813.
13. EVERETT K.D.E., BUSH R.M. & ANDERSEN A.A. (1999). Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 415–440.
14. EVERETT K.D.E., HORNING L.J. & ANDERSEN A.A. (1999). Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 575–580.
15. GEENS T., DEWITTE A., BOON N. & VANROMPAY D. (2005). Development of a *Chlamydophila psittaci* species-specific and genotype-specific Real-Time PCR. *Vet. Res.*, **36**, 1–11.
16. GEENS T., DESPLANQUES A., VAN LOOCK M., BONNER B.M., KALETA E.F., MAGNINO S., ANDERSEN A.A., EVERETT K.D. & VANROMPAY D. (2005). Sequencing of the *Chlamydophila psittaci* ompA gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2456–2461.
17. GRIMES J.E. (1985). Direct complement fixation and isolation attempts for detecting *Chlamydia psittaci* infection of psittacine birds. *Avian Dis.*, **29**, 837–877.
18. GRIMES J.E. & ARIZMENDI F. (1996). Usefulness and limitations of three serologic methods for diagnosing or excluding chlamydiosis in birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **209**, 747–750.
19. GRIMES J.E., GRUMBLES L.C. & MOORE R.W. (1970). Complement fixation and haemagglutination antigens from a chlamydial (ornithosis) agent grown in cell cultures. *Can. J. Comp. Med.*, **34**, 256–260.
20. GRIMES J.E., PHALEN D.N. & ARIZMENDI F. (1993). Chlamydia latex agglutination antigen and protocol improvement and psittacine bird anti-chlamydial immunoglobulin reactivity. *Avian Dis.*, **37**, 817–824.
21. GRIMES J.E., TULLY T.N. JR, ARIZMENDI F. & PHALEN D.N. (1994). Elementary body agglutination for rapidly demonstrating chlamydial agglutinins in avian serum with emphasis on testing cockatiels. *Avian Dis.*, **38**, 822–831.
22. HEWINSON R.G., GRIFFITHS P.C., BEVAN B.J., KIRWAN S.E.S., FIELD M.E., WOODWARD M.J. & DAWSON M. (1997). Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, **54**, 155–166.
23. MESSMER T.O., SKELTON S.K., MORONEY J.F., DAUGHARTY H. & FIELDS B.S. (1997). Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2043–2046.
24. MOHAN R. (1984). Epidemiologic and laboratory observations of *Chlamydia psittaci* infection in pet birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **184**, 1372–1374.
25. MOORE F.M. & PETRAK M.L. (1985). *Chlamydia* immuno reactivity in birds with psittacosis: Localization of chlamydiae by the peroxidase antiperoxidase method. *Avian Dis.*, **29**, 1036–1042.
26. PAGE L.A. (1974). Application of an agar gel precipitin test to the serodiagnosis of avian chlamydiosis. *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians.*, **17**, 51–61.
27. PAUL I.D. (1982). The growth of chlamydia in McCoy cells treated with emetine. *Med. Lab. Sci.*, **39**, 15–32.

28. SACHSE K. & HOTZEL H. (2003). Detection and differentiation of *Chlamydiae* by nested PCR. In: PCR Detection of Microbial Pathogens, Sachse K. & Frey J., eds. Humana Press., New Jersey, USA, 123–136.
29. SACHSE K., HOTZEL H., SLICKERS P., ELLINGER T. & EHRLICH R. (2005). DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila*. *Mol. Cell Probes*, **19**, 41–50.
30. SAYADA C., ANDERSEN A.A., STOREY C., MILON A., EB F., HASHIMOTO O.N., HIRAI K., ELION J. & DENAMUR E. (1995). Usefulness of omp1 restriction mapping for avian *Chlamydia psittaci* isolate differentiation. *Res. Microbiol.*, **146**, 155–165.
31. SMITH K.A., BRADLEY K.K., STOBIEKSKI M.G. & TENGELSEN L.A. (2005). Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* (formerly *Chlamydia psittaci*) infection among humans (psittacosis) and pet birds, 2005. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **226**, 532–539.
32. SPENCER W. N. & JOHNSON F.W.A. (1983). Simple transport medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical material. *Vet. Rec.*, **113**, 535–536.
33. SUDLER C., HOELZLE L., SCHILLER I. & HOOP R. (2004). Molecular characterisation of chlamydial isolates from birds. *Vet. Microbiol.*, **98**, 235–241.
34. TAKASHIMA I., IMAI Y., KARIWA H. & HASHIMOTO N. (1996). Polymerase chain-reaction for the detection of *Chlamydia psittaci* in the feces of budgerigars. *Microbiol. Immunol.*, **40**, 21–26.
35. VAN LOOCK M., VANROMPAY D., HERRMANN B., VANDER S., VOLCKAERT G., GODDEERIS B. & EVERETT K. (2003). Missing links in the divergence of *Chlamydophila abortus* from *Chlamydophila psittaci*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **53**, 761–770.
36. VAN LOOCK M., VERMINNEN K., MESSMER T.O., VOLCKAERT G., GODDEERIS B.M. & VANROMPAY D. (2005). Use of a nested PCR-enzyme immunoassay with an internal control to detect *Chlamydophila psittaci* in turkeys. *BMC Infect. Dis.*, **5**, 76
37. VANROMPAY D., BUTAYE P., SAYADA C., DUCATELLE R. & HAESBROUCK F. (1997). Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using omp1 restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Res. Microbiol.*, **148**, 327–333.
38. VANROMPAY D., DUCATELLE R. & HAESBROUCK F. (1992). Diagnosis of avian chlamydiosis; specificity of the modified Gimenez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures. *J. Vet. Med. [B]*, **39**, 105–112.
39. VANROMPAY D., DUCATELLE R. & HAESBROUCK F. (1995). *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet. Microbiol.*, **45**, 93–119.
40. VANROMPAY D., DUCATELLE R., HAESBROUCK F. & HENDRICKX W. (1993). Primary pathogenicity of an European isolate of *Chlamydia psittaci* from turkey poults. *Vet. Microbiol.*, **38**, 103–113.
41. VANROMPAY D., VAN NEROM A., DUCATELLE R. & HAESBROUCK F. (1994). Evaluation of five immunoassays for detection of *Chlamydia psittaci* in cloacal and conjunctival specimens from turkeys. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1470–1474.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la Chlamydiose aviaire (se reporter à la liste de la partie 3 de ce Manuel Terrestre ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

BRONCHITE INFECTIEUSE AVIAIRE

RÉSUMÉ

La bronchite infectieuse aviaire (BI) est due à un coronavirus, le virus de bronchite infectieuse (VBI). Ce virus provoque des infections surtout chez les poulets et est un agent pathogène important des oiseaux de production (viande ou œufs). La BI est une maladie contagieuse aiguë caractérisée principalement par de symptômes respiratoires chez les jeunes oiseaux. Chez les poules on observe souvent une baisse de la production et de la qualité des œufs. Certaines souches de virus peuvent provoquer des néphrites interstitielles et de la mortalité. La sévérité des infections respiratoires dues au virus de la bronchite infectieuse (VBI) est augmentée lors de la présence d'autres agents pathogènes bactériens entraînant une infection des sacs aériens. L'isolement du virus ou la détection de l'acide nucléique viral à partir des élevages affectés sont indispensables au diagnostic de la BI. La mise en évidence d'une augmentation du taux d'anticorps sériques peut aussi se révéler utile. L'utilisation généralisée de vaccins à virus vivants et inactivés peut compliquer à la fois l'isolement du virus et le diagnostic sérologique de la BI. L'apparition de souches antigéniques variantes peut expliquer l'inefficacité de l'immunité induite par la vaccination.

Le recours au laboratoire est indispensable au diagnostic. L'isolement et l'identification du virus sont les méthodes de choix. Les techniques de transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) sont couramment utilisées pour identifier le génotype du VBI. Les tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) et les méthodes immuno-enzymatique (ELISA) sont souvent utilisées pour les suivis sérologiques des élevages. On peut aussi associer d'autres tests comme la microscopie électronique, les anticorps monoclonaux, la séroneutralisation virale (SN), les tests immuno-histochimiques ou de fluorescence et les épreuves virulentes après vaccination sur poulets.

Identification de l'agent pathogène : *pour la forme respiratoire classique, le VBI est le plus souvent isolé avec succès de la muqueuse trachéale et du poumon dans les jours ou la semaine qui suivent l'infection. Pour les autres formes de la BI, les meilleures sources de virus sont constituées par les reins, l'oviducte, les amygdales caecales ou le proventricule selon la pathogénie de la maladie.*

Les embryons de poulets provenant d'élevages exempts d'agents pathogènes spécifiques ou des anneaux de trachée d'embryons sont utilisés pour l'isolement viral. L'inoculation de la cavité allantoïdienne avec le VBI entraîne des embryons chétifs, rabougris avec une dystrophie des plumes et des dépôts d'urate dans le mésonéphros rénal, généralement en moins de trois passages. L'isolement sur anneaux de trachéaux présente l'avantage de permettre l'observation d'une stase des cils trachéaux dès la première inoculation. La RT-PCR est de plus en plus utilisée pour l'identification du génotype de la glycoprotéine des spicules (S) des souches isolées sur le terrain. Le typage génétique sur la base d'amorces spécifiques de la sous-unité S1 du gène S ou le séquençage du même gène donnent, généralement mais pas toujours, les mêmes résultats que le sérotypage par IHA ou la SN. Les techniques sérologiques IHA ou SN utilisant des anticorps spécifiques peut s'avérer utile pour définir les sérotypes.

Épreuves sérologiques : *des kits ELISA commercialisés peuvent être utilisés pour le suivi de la réponse humorale. Les antigènes de ces kits donnent des réactions croisées entre les sérotypes et permettent des suivis des réponses sérologiques après vaccination et après épreuves virulentes de terrain notamment chez les jeunes poulets. Du fait des infections multiples et des vaccinations, les sérums des reproducteurs et des pondeuses contiennent des anticorps non spécifiques et, le diagnostic sérologique sur la base de l'IHA ne peut être utilisé avec un degré élevé de confiance.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : on peut utiliser des vaccins à virus vivants atténués et des vaccins à virus inactivés adjuvés huileux. Les vaccins à virus vivants, atténués par passage en série sur œufs embryonnés ou par traitement thermique, confèrent une meilleure immunité locale au niveau du tractus respiratoire que les vaccins inactivés. Certains vaccins à virus vivants présentent le risque d'un pouvoir pathogène résiduel associé à une réversibilité de l'atténuation vaccinale dans les élevages. Cependant, la vaccination de masse avec des vaccins à virus vivants ne présente généralement pas de danger.

Les vaccins à virus inactivés doivent être administrés individuellement et une simple inoculation n'est pas protectrice si elle n'est pas précédée par l'administration d'un ou de plusieurs vaccins à virus vivant. Ces deux types de vaccins sont disponibles en association avec le vaccin contre la maladie de Newcastle. Dans certains pays, des vaccins multivalents à virus inactivés comprenant les valences maladie de Newcastle, maladie de Gumboro, réovirose et « syndrome chute de ponte 76 » sont disponibles.

A. INTRODUCTION

La bronchite infectieuse aviaire (BI) a été décrite pour la première fois aux États-Unis d'Amérique (USA) dans les années trente en tant que maladie respiratoire aiguë touchant surtout les jeunes poulets. Le virus découvert par la suite fut appelé virus de la bronchite infectieuse aviaire (VBI). Le VBI est un membre du genre *Coronavirus*, famille des *Coronaviridae*, de l'ordre des Nidovirales. Le VBI et d'autres coronavirus aviaires du dindon et du faisan sont classés dans le groupe 3 des coronavirus, avec les coronavirus des mammifères qui comprennent les groupes 1, 2 et 4 (le groupe 4 est le coronavirus le plus récemment identifié comme responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) (6). Les coronavirus sont non-segmentés, de sens positif, avec un génome comprenant un simple brin d'ARN.

Le VBI affecte les poulets de tous âges qui, à part les faisans (10), sont les seules espèces connues affectées naturellement. La maladie se transmet par voie aérienne, directement par contact entre poulets ou indirectement par transmission mécanique (matériel de poulailler ou de conditionnement des œufs contaminé, fumier utilisé comme engrais, visites de fermes, etc.). La BI est rencontrée dans le monde entier sous différentes formes cliniques, la principale étant une maladie respiratoire qui se développe lors d'une infection du tractus respiratoire après inhalation ou ingestion. L'infection de l'oviducte peut provoquer des lésions irréversibles chez les jeunes poulettes. Chez les oiseaux plus âgés, on observe un arrêt de la ponte ou la production d'œufs à coquille mince ou déformée et décolorée. La BI peut provoquer des troubles rénaux avec une néphrite aiguë, une urolithiase, et une mortalité (11). Après une amélioration apparente, une néphrite chronique peut provoquer une mort subite un peu plus tard. Une maladie du proventricule due au VBI a aussi été décrite (49). Les souches sauvages et vaccinales peuvent persister dans les amygdales caecales du tractus intestinal et peuvent être excrétées dans les fientes pendant des semaines voire plus longtemps encore chez les oiseaux apparemment sains (2). Pour une synthèse approfondie de la bronchite infectieuse, voir Cavanagh & Naqi (11). Une étude détaillée de l'antigène du VBI, du génome et des tests de détection par De Witt (24) est aussi disponible.

Il n'a jamais été observé une infection humaine avec le VBI.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

La confirmation du diagnostic est obtenue par la mise en évidence de l'antigène viral, parfois associée à l'examen sérologique. L'emploi généralisé de vaccins atténués ou inactivés peut compliquer le diagnostic utilisant des méthodes sérologiques car les anticorps d'origines vaccinale et sauvage ne peuvent pas être toujours distingués. La persistance d'un vaccin à virus vivant peut aussi compliquer les essais d'isolement de l'agent causal.

1. Identification de l'agent pathogène

a) Prélèvements

Les prélèvements sur les oiseaux doivent se rapporter à la maladie suspectée et être effectués dès l'apparition des symptômes. Les échantillons doivent être conditionnés dans des milieux de transport sous froid et congelés dès que possible. La chaîne du froid de l'élevage au laboratoire doit être maintenue. Dans le cas d'une maladie respiratoire aiguë, des écouvillons du tractus respiratoire supérieur des oiseaux vivants ou des prélèvements de trachée et de poumons des oiseaux malades doivent être récoltés et conservés dans un milieu de transport comportant de la pénicilline (10 000 unités internationales [UI]/ml) et de la streptomycine (10 mg/ml) et maintenus sous glace ou congelés. Chez des oiseaux atteints de néphrite ou

de troubles de la ponte, les prélèvements doivent concerner les reins ou l'oviducte en plus des prélèvements de l'appareil respiratoire. Dans certains cas, on peut souhaiter réaliser l'identification du VBI sans isolement du virus. Dans ce cas, des écouvillons du tractus respiratoire ou du cloaque peuvent être envoyés directement sans être conservés dans un milieu de transport (8). Lors de suspicion de néphrite due à la BI, des échantillons de reins doivent être effectués sur des carcasses de poulets récemment euthanasiés pour l'examen histopathologique ou isolement du virus. Les prélèvements sanguins d'oiseaux atteints d'une forme aiguë ou d'oiseaux convalescents doivent aussi faire l'objet d'un examen sérologique. Un pourcentage élevé d'isollements réussis du virus a été rapporté des amygdales caecales ou des fèces (2). Cependant, les isolats à partir du tractus intestinal peuvent ne pas être en relation avec l'infection la plus récente ou avec la maladie clinique. L'isolement du VBI peut être facilité par l'emploi de poulets exempts d'agents pathogènes spécifiques (EAPS ou SPF pour *specific pathogen free*) utilisés comme sentinelles à plusieurs reprises dans des élevages industriels (25).

b) Culture

Des suspensions de prélèvements tissulaires diluées (10 à 20 /100 ml soit 10 à 20 %) sont préparées avec une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) ou un milieu nutritif pour inoculation à l'œuf ou un milieu de culture utilisé pour les cultures d'anneaux trachéaux (CAT) (17). Les suspensions sont clarifiées par centrifugation lente et filtration sur des filtres bactériens (0,2 µ) avant inoculation sur œuf ou sur CAT.

Les œufs embryonnés de poulet et les CAT sont largement utilisés pour effectuer les isollements primaires du virus. Les cultures cellulaires ne sont pas recommandées pour l'isolement primaire car il est souvent nécessaire d'adapter les isolats du VBI sur les œufs embryonnés avant d'observer un effet cytopathogène (ECP) de l'infection virale sur des cellules embryonnaires de rein de poulet.

Les œufs embryonnés utilisés pour isolement du virus doivent provenir de préférence de poulets EAPS ou de reproducteurs n'ayant jamais été infectés ou vaccinés. Le plus souvent, 0,1 à 0,2 ml du surnageant de l'échantillon est inoculé dans la cavité allantoïdienne d'embryons âgés de 9 à 11 jours. Les œufs sont ensuite mirés tous les jours pendant 7 jours et toute mortalité survenant dans les 24 h doit être considérée comme non spécifique et les œufs sont éliminés. Habituellement, l'inoculum initial n'a pas d'effets macroscopiques visibles sur l'embryon, sauf s'il s'agit d'une souche vaccinale déjà adaptée à l'œuf. Normalement, les liquides allantoïdiens de tous les œufs, récoltés 3 jours après l'inoculation, sont mélangés. Ce mélange est dilué au 1/5 ou au 1/10 dans un milieu additionné d'antibiotiques en vue d'un nouveau passage sur d'autres œufs jusqu'à un maximum de 3 à 4 passages. En règle générale, une souche sauvage induit des lésions visibles sur l'embryon (embryons chétifs, rabougris avec dystrophie des plumes et des dépôts d'urate dans le mésonéphros rénal) du deuxième au quatrième passage. Aux passages suivants, on peut observer une mortalité embryonnaire au fur et à mesure que la souche s'adapte à la culture sur œuf. D'autres virus, notamment des adénovirus qui sont souvent retrouvés dans les tractus respiratoire, peuvent aussi provoquer des lésions similaires au VBI. Le liquide allantoïdien ne doit pas agglutiner les hématies et l'isolement du VBI doit être confirmé par typages sérologique et génotypique. Les liquides allantoïdiens infectieux sont conservés à -20 °C ou moins pour une courte durée de conservation, ou à -60 °C pour une conservation longue ou, enfin, à 4 °C après lyophilisation.

Les CAT préparés à partir d'embryons âgés de 20 jours peuvent être utilisés directement pour isoler le VBI à partir d'échantillons du terrain (17). Un système de coupe automatique est nécessaire pour obtenir des sections transversales adéquates pour cette technique (21). Les anneaux doivent avoir 0,5 à 1 mm d'épaisseur et doivent être maintenus dans un milieu d'Eagle's N-2-hydroxyethylpiperazine N'-2-ethanesulphonic acid (HEPES) sur tubes tournants (15 tours/mn) à 37 °C. L'infection de ces cultures de trachées se traduit par une ciliostase en 24 à 48 h. La ciliostase peut être produite par d'autres virus et la suspicion d'un cas de BI doit être confirmée par des tests sérologiques ou génotypiques.

c) Méthodes d'identification

Les premiers tests effectués sur les isolats de VBI ont pour but d'éliminer les autres virus. Les membranes chorio-allantoïques des œufs infectés sont récoltées, homogénéisées et testées pour les adénovirus aviaires du groupe 1 par immunodiffusion ou par amplification en chaîne par polymérase (PCR). Les infections des élevages industriels par les adénovirus aviaires du groupe 1 sont fréquentes et les lésions produites sur les embryons ne sont pas distinguables de celles dues au VBI. En outre, les liquides allantoïdiens récoltés n'entraînent pas l'hémagglutination des globules rouges de poulet. Les méthodes moléculaires (RT-PCR [transcription inverse couplée à une PCR] ou RT-PCR suivie d'une RFLP [analyse du polymorphisme des fragments de restriction]) sont utilisées fréquemment pour identifier un isolat de VBI. D'autres techniques peuvent aussi être utilisées : les cellules présentes dans le liquide allantoïdien des œufs infectés peuvent être testées en immunofluorescence pour la recherche de l'antigène du VBI (12), et l'examen direct en microscopie électronique en contraste négatif permet de révéler les particules virales ayant l'aspect caractéristique des coronavirus dans les liquides allantoïdiens ou le milieu de culture des CAT.

après concentration. La présence du VBI dans le liquide allantoïdien peut être détectée par amplification avec la RT-PCR et l'emploi d'une sonde ADN dans un test dot-hybridation (32). Le marquage direct par immunofluorescence des CAT permet une détection rapide du VBI (3). L'immunohistochimie, avec l'emploi d'anticorps monoclonaux (AcM) spécifiques de groupe peut aussi permettre d'identifier le VBI sur les membranes chorioallantoïdiennes infectées (43).

d) Identification des sérotypes

La variation antigénique entre les souches du VBI sont très fréquentes (11, 16, 23, 28, 31), mais il n'existe pas actuellement de classification définitive sur laquelle tout le monde s'accorde. Néanmoins les relations et les différences antigéniques entre les souches sont importantes car les vaccins basés sur un sérotype particulier peuvent n'offrir qu'une faible protection, voire pas de protection du tout, vis-à-vis d'un groupe antigéniquement différent. Du fait de l'émergence régulière de variants antigéniques, les virus et, par conséquent les aspects de la maladie et les vaccins utilisés, peuvent être tout à fait différents selon la région géographique. Un contrôle permanent des virus sur le terrain est nécessaire pour la production de vaccins efficaces face à la survenue de variants antigéniques. Le sérotypage des isolats de VBI et des souches a été effectué avec les tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) (1, 36), et de séroneutralisation (SN) sur embryons de poulet (23), sur CAT (22) et sur cultures cellulaires (29). La neutralisation des foyers immunofluorescents a été aussi utilisée pour différencier les souches (19).

Des anticorps monoclonaux (AcM), utilisés habituellement avec la méthode immuno-enzymatique (ELISA), sont utiles pour différencier les souches et les groupes du VBI (30, 38). Les limites dans leur utilisation pour définir le sérotype du VBI sont liées au manque d'AcMs ou d'hybridomes et à la nécessité de produire de nouveaux AcMs avec une bonne spécificité permettant de suivre le nombre toujours en augmentation des sérotypes variants émergents de la BI (34).

e) Identification du génotype

Le génotypage par RT-PCR a largement remplacé le sérotypage par IHA et SN pour déterminer l'identité des souches sauvages. Les bases moléculaires de la variation antigénique ont été examinées, généralement par le séquençage du nucléotide du gène codant la protéine des spicules (S) ou, plus spécifiquement le gène codant la sous-unité S1 de la protéine S (5, 40) où le plus grand nombre d'épitopes identifiés par des anticorps neutralisants est observé (39). On n'observe pas une corrélation exacte avec les résultats de l'IHA ou de la SN dans la mesure où si d'un côté les différents génotypes présentent généralement de grandes différences (20 à 50 %) dans les séquences d'acides aminés de la sous-unité S1 (40), des virus autres qui sont clairement différenciables par séroneutralisation ne présentent seulement quant à eux que 2 à 3 % de différences dans les séquences d'acides aminés (5). Cependant, les résultats obtenus avec la séquence S1 en comparaison avec le sérotype identifié par séroneutralisation permettent de sélectionner les souches vaccinales sur la base des données fournies par le séquençage.

Le premier avantage des techniques moléculaires est leur rapidité et leur capacité à détecter une grande variété de génotypes selon les tests employés. La RT-PCR RFLP distingue les différents sérotypes de VBI sur la base des profils de bandes uniques obtenus par électrophorèse des fragments de restriction obtenus par digestion enzymatique de S1 après amplification du gène par RT-PCR (33, 41). La méthode RT-PCR RFLP peut être utilisée en association avec une sonde marquée à la biotine pour détecter au préalable le VBI dans les liquides récoltés à partir d'œufs inoculés avec des échantillons cliniques (32). La RT-PCR RFLP peut identifier tous les sérotypes connus de VBI, ainsi que les variants.

La RT-PCR spécifique de génotype S1 peut identifier tous les sérotypes du VBI (35). Les amorces du gène S1 spécifiques pour les sérotypes Massachusetts (Mass), Connecticut, Arkansas, et JMK sont utilisées en association avec une paire d'amorces universelles qui amplifie tous les sérotypes de VBI. Les amorces pour les sérotypes DE/072/92 et Californie ont aussi été mises au point. Les autres sérotypes variants peuvent être reconnus comme étant des VBI en employant les amorces classiques, mais le sérotype ne peut pas être déterminé. Les infections multiples dues à plusieurs sérotypes de VBI peuvent être diagnostiquées.

Le séquençage des nucléotides d'un fragment significatif au plan diagnostique du gène S1 représente la technique la plus utile pour différencier les souches du VBI, et est devenue la méthode de choix dans de nombreux laboratoires. Le séquençage a aussi permis d'observer qu'il se produisait souvent une recombinaison entre les souches de VBI (7, 50). Il est possible d'utiliser le séquençage du produit de la RT-PCR (partie terminale hypervariable de S1) à des fins diagnostiques pour identifier les isolats ou les variants sauvages reconnus auparavant comme VBI (37). L'analyse et la comparaison des séquences de variants et d'isolats sauvages inconnus avec les souches de référence pour vérifier leur degré de parenté sont des avantages importants du séquençage.

Récemment, il a été montré que les coronavirus isolés de dindons et de faisans étaient génétiquement similaires au VBI, avec approximativement 90 % d'homologie pour les nucléotides situés dans la région II

hautement conservée de la région 3' non traduites du génome du VBI (9, 10). Le rôle possible de ces coronavirus dans les infections à VBI n'a pas été déterminé.

L'emploi essentiel des tests de RT-PCR est l'identification du virus et les études épidémiologiques lors de foyers de BI. Cependant, les tests actuels de RT-PCR ne donnent pas d'informations sur le pouvoir pathogène des virus.

- **Protocole de la RT-PCR**

- i) *Extraction de l'ARN viral*

Toute méthode d'extraction de l'ARN peut être utilisée. De nombreux protocoles sont publiés dans des revues, des livres et sur le web. Cependant, pour extraire de grandes quantités d'ARN à partir du liquide allantoïdien, il est recommandé d'employer le kit Qiagen Viral RNA Mini Kit (www.qiagen.com). De son côté, le kit Qiagen RNeasy Mini Kit est recommandée pour extraire l'ARN du VBI à partir de tissus ou d'écouvillons. Tous les ARN extraits doivent être conservés entre -20 °C et -80 °C jusqu'au moment de l'analyse. Pour de longues durées, la conservation de l'ARN à -80 °C est recommandée.

- ii) *Oligonucléotides personnalisés*

Des oligonucléotides personnalisés peuvent être achetés auprès de tous les fournisseurs. La société Operon (www.operon.com) produit depuis des années des oligonucléotides de qualité. Le gène cible pour la caractérisation du VBI est la sous-unité S1 du gène de la glycoprotéine des spicules. Une paire d'amorces fréquemment utilisée pour l'amplification de diverses souches de VBI est : S15' mod (sens) : 5'-TGA-AAA-CTG-AAC-AAA-AGA-3' et CK2 (anti-sens) : 5'-CNG-TRT-TRT-AYT-GRC-A-3' (26). Le produit de l'amplification avec S15'mod/CK2 a une longueur d'environ 700 pb commençant au début du gène S1 et s'étendant aux deux régions hypervariables utilisées pour le génotypage.

- iii) *Technique de la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase*

De nombreux kits de RT-PCR (à un ou deux temps) sont disponibles dans le commerce chez des fournisseurs qui garantissent sensibilité et fiabilité. Le kit recommandé est le kit en deux temps de Applied Biosystems (<http://www.appliedbiosystems.com>). La transcription inverse est effectuée selon les instructions du fournisseur. L'amorçage pour la RT est réalisé en utilisant des hexamères fournis avec le kit ou l'amorce de la PCR inverse, dans ce cas il s'agit de l'amorce CK2 (35). Les paramètres d'un cycle d'amplification sont les suivants : 25 °C pendant 10 min, 42 °C pendant 25 min, 95 °C pendant 5 min et maintien à 4 °C. Le volume total pour la réaction de transcription inverse est ajouté au mélange d'échantillon. Les paramètres de la PCR sont : 95 °C pendant 2 min, 45 cycles à 95 °C pendant 30 s, 52 °C pendant 30 s, 68 °C pendant 30 s, extension finale à 68 °C pendant 12 min et maintien à 4 °C. Les échantillons sont concentrés dans un dessiccateur une nuit ou avec une centrifugeuse sous vide. Les échantillons desséchés sont remis en suspension dans 12 µl d'eau traitée au DEPC et 6 µl au tampon d'électrophorèse, avant électrophorèse sur un gel à 1,8 % d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Les gels sont visualisés sous lumière ultra-violette. Les bandes sont comparées à une échelle commercialisée (degrés de 100 pb) et à un témoin positif VBI.

- iv) *Séquençage du gène S1*

Les bandes visualisées sur le gel d'agarose qui ont la même taille que celles du témoin positif sont découpées. Le produit de PCR est séparé du gel grâce au kit Qiagen Gel Extraction kit (www.qiagen.com) ou tout autre kit d'extraction du commerce. Les produits de PCR purifiés sont déposés sur un nouveau gel (1,8 % d'agarose et bromure d'éthidium) pour déterminer la quantité de produit disponible. Environ 20 µl (10 ng/µl) de produit de PCR sont nécessaires pour le séquençage. Le séquençage peut être effectué au Centre de séquençage de l'Université du Delaware (University of Delaware Sequencing & Genotyping Center, Newark, DE [<http://www.udel.edu/dnasequence>]) ou dans tout autre établissement. Les chromatogrammes des séquences sont analysés en utilisant le logiciel DNASTar analysis ou en ligne :

<http://www.mekentosj.com/4peaks/>, ou http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html.

Les séquences éditées des isolats de VBI sont caractérisées à l'aide de BLASTn pour l'analyse des nucléotides ou BLASTp pour celle des protéines (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2. Épreuves sérologiques

De nombreuses épreuves ont été décrites. Les épreuves considérées dans cette partie comprennent la séroneutralisation (SN) (23), l'immunodiffusion en gélose (IDG) (48), l'inhibition de l'héماغglutination (IHA) (1) et la technique ELISA (42). Chaque épreuve présente des avantages et des inconvénients dans les domaines de la pratique, de la spécificité, de la sensibilité et du coût. En général, pour les épreuves sérologiques de routine, les tests de SN sont trop coûteux et peu pratiques et l'épreuve d'IDG manque de sensibilité. Les tests d'IHA et ELISA conviennent le mieux aux recherches sérologiques de routine. Les tests ELISA sont utiles pour les suivis des expositions au VBI et peuvent détecter une réponse humorale dirigée contre tous les sérotypes. L'IHA, quand elle est réalisée sur des sérums de jeunes poulets (poulettes ou poulet de chair), peut donner des indications sur les

anticorps spécifiques de sérotype de l'élevage. Une surveillance sérologique régulière des élevages avec la recherche des anticorps BI représente une aide pour vérifier le niveau de réponse au vaccin ou à une épreuve virulente. Du fait que de nombreux sérums de poulet, en particulier d'oiseaux plus âgés, contiennent des anticorps pouvant montrer une réaction croisée importante avec des souches différentes antigéniquement, on ne peut retenir comme certainement fiable le diagnostic sérologique d'une suspicion clinique de BI.

a) Test de séroneutralisation

Pour les tests de SN tous les sérums doivent être préalablement chauffés à la température de 56 °C pendant 30 min. Le virus est mélangé avec du sérum et placé en incubation pendant 30 à 60 min à 37 °C ou à la température du laboratoire. On utilise le plus souvent des œufs embryonnés de poule, mais on peut aussi employer des cultures d'anneaux de trachée ou des cultures cellulaires. Deux méthodes ont été utilisées pour estimer le taux d'anticorps neutralisants. L'une emploie une concentration sérique constante réagissant avec des dilutions croissantes de virus (méthode alpha) et l'autre emploie un titre constant de virus et des dilutions croissantes de sérum (méthode bêta).

Dans la méthode alpha, des dilutions croissantes au 1/10^e du virus adapté à l'œuf sont ajoutées à une dilution fixe d'antisérum (habituellement au 1/5^e) et chaque mélange est inoculé à un groupe de 5 à 10 œufs embryonnés. Le virus est titré parallèlement. La dose létale est calculée selon la méthode de Kärber ou celle de Reed et Muench. Les résultats sont exprimés en index de neutralisation représentant la différence logarithmique (log₁₀) entre le titre du virus et celui des mélanges virus/antisérum. La valeur de l'index de neutralisation peut atteindre 4,5 à 7,0 dans le cas d'un mélange homologue virus/antisérum ; une valeur inférieure à 1,5 n'est pas spécifique mais un index de 1,5 peut être rencontré avec un virus hétérologue.

La méthode bêta est la plus utilisée pour le test de séroneutralisation sur œufs embryonnés. Des dilutions croissantes d'antisérum (au 1/2 ou au 1/4) sont ajoutées à un même volume de virus à dilution constante, généralement titrant 100 ou 200 DIE₅₀ (dose de virus infectant 50 % des embryons) par 0,05 ml et 0,1 ml de chaque mélange est inoculé dans la cavité allantoïque de chacun des 5 à 10 œufs embryonnés utilisés. Un contrôle du titre du virus est pratiqué simultanément pour vérifier que le titre de la dilution de la solution virale reste compris entre 10^{1,5} et 10^{2,5} DIE₅₀. La dose létale est calculée selon la méthode de Kärber ou celle de Reed et Muench comme précédemment, mais les dilutions sont exprimées en logarithme de base 2 (log₂). Cette méthode bêta (virus constant/sérum variable) est aussi employée dans les tests de neutralisation sur cultures de trachées avec l'emploi de 5 tubes par dilution de sérum selon les méthodes classiques de virologie (22). Les résultats sont calculés selon la méthode Reed et Muench, et le titre du virus est exprimé en doses ciliostatiques moyennes par unité de volume (log₁₀ DC₅₀). Les titres sériques sont aussi exprimés réciproquement en logarithme de base 2 (log₂). Ce test est plus sensible que les autres, mais les difficultés techniques rencontrées pour sa mise en œuvre ne permettent pas son utilisation en pratique courante.

b) L'inhibition de l'hémagglutination

Un protocole standard pour le test d'IHA pour le VBI a été décrit (1) et la méthode décrite ci-dessous est basée sur ce test standard. Des souches ou des isolats du VBI peuvent agglutiner les hématies de poulets (HP) après un traitement enzymatique (neuraminidase) (44, 45). La souche utilisée pour produire l'antigène peut varier selon le diagnostic souhaité. L'antigène pour le test IHA est préparé à partir de liquides allantoïques infectés par le VBI.

Les tests d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination sont réalisés à 4 °C.

• Test d'hémagglutination

- i) Distribuer 0,025 ml d'un tampon PBS isotonique, pH 7,0 à 7,4, dans chaque puits d'une microplaque à fond en U ou en V en matière plastique ;
- ii) Placer 0,025 ml de l'antigène viral dans le premier puits. Pour une délimitation plus précise du contenu hémagglutinant, il faut faire des séries de dilutions initiales rapprochées comme au 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, etc. ;
- iii) Préparer des dilutions de l'antigène viral de 2 en 2 d'un volume de 0,025 ml dans toute la plaque ;
- iv) Distribuer de nouveau 0,025 ml du tampon PBS dans chaque puits ;
- v) Distribuer 0,025 ml de la suspension, d'hématies de poulet à 1 % (v/v) dans chaque puits ;
- vi) Mélanger en remuant doucement la microplaque et laisser les hématies se déposer pendant 40 min à 4 °C, lorsque le témoin « hématies de poulet » est stabilisé en présentant une pastille distincte ronde ;

- vii) L'HA est déterminée en inclinant la plaque et en observant la présence ou l'absence de l'hémagglutination (aspect en « larme » des hématies qui coulent). Le titrage doit être lu à la plus haute dilution pour laquelle se produit une hémagglutination complète soit une HA à 100 % représentant l'unité hémagglutinante (UHA). Cela peut être calculé avec précision à partir des séries initiales de dilution.

- **Test d'inhibition de l'hémagglutination**

Le test d'IHA est utilisé pour le diagnostic et pour les programmes de surveillance de la réponse vaccinale des élevages.

- i) Distribuer 0,025 ml de PBS dans chaque cupule d'une plaque à fond en U ou en V ;
- ii) Placer 0,025 ml de sérum dans la première cupule de la plaque ;
- iii) Effectuer des dilutions de 2 en 2 de 0,025 ml de volume de sérum dans la microplaque ;
- iv) Ajouter 0,025 ml contenant 4 unités hémagglutinantes d'antigène viral dans chaque cupule et attendre 30 min ;
- v) Ajouter 0,025 ml d'une suspension d'hématies de poulet à 1 % (v/v) dans chaque cupule et, après avoir mélangé doucement, laisser les hématies se déposer pendant environ 40 min alors que les hématies témoins se déposent en présentant un bouton rond très net ;
- vi) Le titre du test d'IHA correspond à la plus haute dilution de sérum provoquant une complète inhibition de 4 unités hémagglutinantes de l'antigène viral. L'agglutination est appréciée plus exactement en inclinant les plaques. Seules les cupules où les hématies se déposent de façon identique que dans les cupules témoins (contenant seulement 0,025 ml de la suspension d'hématies et 0,05 ml de PBS) doivent être considérées comme ayant montré une inhibition ;
- vii) La validité des résultats doit être appréciée à l'aide d'un sérum témoin négatif qui ne devra pas présenter un titre $>2^2$, et un sérum témoin positif dont le titre devra être égal au titre connu à plus ou moins une dilution près ;
- viii) Les sérums sont habituellement considérés comme positifs s'ils présentent un titre égal ou supérieur à 2^4 . Cependant, il faut noter que parfois dans les élevages EAPS, une très faible proportion d'oiseaux peut présenter un titre non spécifique de 2^4 , mais habituellement ces oiseaux sont âgés de plus de 1 an.

c) Méthode immuno-enzymatique

La technique ELISA est une méthode sérologique sensible, précoce et donnant les taux d'anticorps les plus élevés par comparaison avec les autres épreuves (42). Elle n'est pas spécifique d'une souche ou d'un type, mais elle est appropriée pour le contrôle de la réponse vaccinale sur le terrain. Des kits de diagnostic ELISA existent dans le commerce – ils sont basés sur différentes stratégies de détection des anticorps dirigés contre le VBI. Habituellement de tels kits ont été évalués et validés par le fabricant et il importe de suivre scrupuleusement les instructions du mode d'emploi. Le test ELISA est largement utilisé pour identifier les élevages de poulets infectés par le virus BI et présentant un titre important. Si la BI réapparaît dans un autre élevage de cette ferme, il faut tenter d'isoler le virus pour ensuite le géotyper par RFLP ou par séquençage S1.

d) Immunodiffusion en gélose (IDG)

L'IDG peut être utilisée pour le diagnostic de la BI (48). L'antigène est préparé à partir d'un homogénat de membranes chorioallantoïques d'embryons de poulets infectés. La souche Beaudette létale pour l'embryon est souvent utilisée pour produire l'antigène. Le test manque de sensibilité et risque de donner des résultats inégaux car la présence et la persistance des anticorps précipitant chez les oiseaux varient selon les individus.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Tous les virus des vaccins à virus vivants ou inactivés doivent être autorisés. Les souches utilisées dans les vaccins à virus vivants nécessitent généralement une atténuation. Actuellement de nombreux pays n'autorisent que des vaccins à virus vivants préparés à partir du type Massachusetts comme la souche H 120. Certains pays peuvent aussi autoriser des vaccins à virus vivants avec d'autres souches comme les souches Connecticut, Arkansas ou Delaware 072 (États-Unis d'Amérique) ou la souche 4/91 (Royaume-Uni). Les vaccins à virus vivants peuvent être utilisés en aérosols, dans l'eau de boisson ou par administration oculaire.

L'efficacité d'un vaccin inactivé dépend en grande partie d'une primovaccination avec un (ou des) vaccin(s) à virus vivant. Les vaccins à virus inactivés sont administrés individuellement aux oiseaux par une injection intramusculaire ou sous-cutanée. Les souches variantes doivent être utilisées dans la préparation d'auto-vaccins à virus inactivés pour le contrôle de la BI dans les élevages de poules pondeuses ou de reproducteurs.

Les vaccins à virus vivants confèrent une meilleure immunité locale au niveau du tractus respiratoire et permettent une protection contre un large spectre de souches du terrain (18). Cependant, les vaccins à virus vivants ne peuvent protéger les élevages de pondeuses pendant toute leur vie économique en raison de risque important de survenue de sérotypes variants dans des élevages d'âges variables et les baisses du taux de ponte dès l'âge de 40 semaines n'est pas rare (27). Certains vaccins à virus vivants présentent un effet pathogène résiduel provoquant une réaction vaccinale dans l'élevage. Cependant les recommandations concernant le mode d'administration de masse du vaccin (par aérosol ou eau de boisson) à l'élevage, en évitant l'emploi de doses vaccinales insuffisantes, doivent être suivies scrupuleusement si l'on veut protéger de façon satisfaisante tout l'élevage et pour éviter les retours à la virulence. Par ailleurs, l'emploi des vaccins en suivant scrupuleusement les doses recommandées par le fabricant est aussi une précaution pour éviter la réversion qui peut être causée par des doses fractionnées.

Il existe des perspectives de production pour des vaccins génétiquement modifiés (4) et pour une vaccination *in ovo* (47).

Les lignes directrices pour la fabrication de vaccins vétérinaires sont fournies dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices exposées ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont de nature générale. Dans chaque pays où ces vaccins BI sont fabriqués, les normes nationales et internationales doivent être respectées. L'autorité qui délivre les autorisations doit apporter des informations et un avis sur les critères requis. De nos jours, ceux-ci sont souvent présentés en termes généraux pour toute demande que ce soit pour des vaccins – aviaires et mammaliens – à virus vivants ou à virus inactivés, et pour des antiviraux ou antibactériens. Ils doivent aussi satisfaire à tous les critères applicables aux vaccins BI. Pour exemple, se reporter aux réglementations européenne et américaine (13-15, 46).

Les listes des agents étrangers qui doivent être absents continuent à s'allonger. Les producteurs doivent être familiers avec celles qui sont appliquées dans leur pays. Récemment, le virus de la néphrite aviaire et le pneumovirus aviaire ont été ajoutés.

Pour les vaccins BI, on peut rencontrer des différences importantes concernant les épreuves infectieuses pour les tests d'activité et leur validation. Traditionnellement on utilise la souche virulente M-41 du type Massachusetts (Mass 41) pour ces épreuves infectieuses à la fois pour les vaccins à virus vivants et à virus inactivés. Bien que ce type soit encore commun, il n'est plus le seul utilisé ni le principal dans plusieurs pays et il peut être recommandé de préparer des vaccins avec les autres types. Il est logique de réaliser les épreuves infectieuses avec le type de virus présent dans le vaccin. Il est plus difficile d'établir des critères pour la validation d'épreuves infectieuses avec les types non-Massachusetts en raison de leur plus faible virulence en général. Les vaccins à virus inactivés sont destinés à protéger contre les chutes du taux de ponte. L'épreuve classique avec la souche M-41, décrite dans ce chapitre, doit provoquer une chute d'au moins 67 % chez les témoins non vaccinés, mais des taux de chute beaucoup plus bas observés avec d'autres types doivent être considérés comme satisfaisants, en fonction des effets connus et publiés de ces souches sur le terrain. On observe une tendance à assouplir les critères des épreuves infectieuses avec le type Massachusetts et la Pharmacopée européenne définit maintenant une chute de ponte d'au moins 35 % pour les types Massachusetts et d'au moins 15 % pour les types non-Massachusetts lorsque la chute correspond à des données reposant sur des preuves documentées (15).

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Le lot de semence (semence primaire) doit être utilisé pour tous les types de vaccins produits et pour les souches d'épreuve. Chaque virus est dénommé selon la souche, son origine et doit être exempt de toute contamination par d'autres souches de virus BI ou par tout agent contaminant. Les souches de virus destinées aux vaccins ou aux épreuves infectieuses doivent être entreposées séparément.

Pour les vaccins à virus vivants, plusieurs pays n'acceptent que les souches de type Massachusetts. Quelques pays autorisent d'autres souches, généralement celles déjà présentes dans les élevages du pays. L'incorporation d'un type antigénique dans les vaccins à virus à la fois vivants et inactivés doit être justifiée si l'on doute de son existence dans le pays.

b) Méthodes de culture

Toutes les souches virales de semence sont cultivées dans le sac allantoïdien d'embryons de poulets ou sur cultures cellulaires appropriées. Les œufs doivent provenir d'un élevage EAPS.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

- **Pureté**

Chaque lot de semence doit être exempt de toute contamination bactérienne, fongique, mycoplasmatique ou virale.

Pour la détection des virus étrangers, la souche de semence est d'abord traitée avec un antisérum monospécifique de titre élevé contre la souche en cause ou contre un type connu. Le mélange est mis en culture de plusieurs manières pour confirmer l'absence de tout virus connu comme contaminant potentiel. L'antisérum ne doit pas comprendre d'anticorps dirigés contre les adénovirus, le virus de l'encéphalomyélite aviaire, le rotavirus aviaire, le virus de l'anémie infectieuse du poulet, le virus de la variole aviaire, le virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire, le virus influenza A, le virus de la maladie de Newcastle, le virus de la bursite infectieuse, les virus des leucoses aviaires, le réovirus, le virus de la maladie de Marek, l'herpesvirus du dindon, les virus associés aux adénovirus, le virus du syndrome chute de ponte 76 (EDS76), le virus de la néphrite aviaire, le pneumovirus aviaire ou le virus de la réticulo-endothéliose. L'inoculum ajouté dans chaque système de culture utilisé doit contenir une quantité de virus BI neutralisé dont l'infectiosité initiale doit être équivalente à au moins 10 fois la dose minimale du terrain. Ces systèmes sont :

1. des embryons de poulet EAPS âgés de 9 à 11 jours, inoculés à la fois dans le sac allantoïdien et sur la membrane chorioallantoïdienne (deux passages) ;
2. des cultures de fibroblastes d'embryon de poulet, pour les virus leucosiques des sous-groupes A et B. Le test de fixation du complément pour la leucose aviaire (test COFAL) ou le test ELISA en double sandwich pour les antigènes leucosiques spécifiques de groupe est réalisé sur des extraits cellulaires récoltés à 14 jours. Un test d'immunofluorescence pour le virus de la réticuloendothéliose est réalisé sur un tapis cellulaire, sur lamelles couvre-objet, après deux passages ;
3. des cultures de cellules rénales de poulets EAPS sont utilisées pour la recherche d'un effet cytopathogène, d'inclusions cellulaires ou d'agents hémasorbants après des passages correspondant à un temps d'incubation total jamais inférieur à 5 jours et jusqu'à 20 jours ;
4. des poussins EAPS dont l'âge correspond à l'âge minimal recommandé pour la vaccination sont inoculés par la voie intramusculaire avec 100 doses vaccinales et par la voie conjonctivale avec 10 doses vaccinales. Ce test est répété 3 semaines plus tard : les poulets sont inoculés dans la voûte plantaire et par la voie intranasale avec 10 doses vaccinales. Ces poussins sont observés pendant au moins 6 semaines et leur sérum est testé pour la recherche de l'encéphalomyélite aviaire, de la bursite infectieuse, de la maladie de Marek, de la maladie de Newcastle et d'une infection par *Salmonella pullorum*.

- **Activité**

Les vaccins indiqués pour une protection contre les chutes du taux de ponte doivent être testés pour la durée de la réponse humorale. Les titres IHA doivent être en moyenne $> 6 \log_2$ jusqu'à l'âge de 60 semaines. Les épreuves sérologiques doivent être réalisées à des intervalles suffisamment fréquents pour démontrer qu'il n'y a pas eu un effet de rappel provoqué par un VBI extérieur.

Les vaccins indiqués pour la protection des poulets de chair et des poulets d'élevage contre la forme respiratoire de la maladie doivent être testés de la même manière pour la durée de la réponse immunitaire. Cette réponse est testée jusqu'à l'âge de l'abattage pour les poulets de chair et jusqu'à l'âge du rappel vaccinal (le plus souvent à l'âge de 16 à 18 semaines) dans le cas des poulets d'élevage.

- **Innocuité**

Les tests pratiqués sur la souche virale de semence doivent inclure un test sur le risque de retour vers la virulence. La souche de semence des vaccins à virus vivants et inactivés doit être testée pour son innocuité selon les recommandations de la Section C.4.b.

- **Efficacité**

Pour démontrer l'efficacité, un essai doit être réalisé avec des vaccins obtenus à partir du lot de semence primaire et du lot de travail après 5 passages à partir du lot de semence primaire. Ils sont soumis à des tests démontrant leurs effets protecteurs.

Pour les vaccins à virus vivants, au moins 10 poussins EAPS âgés de 3 à 4 semaines sont vaccinés par voie intranasale ou oculaire avec la dose recommandée. Dix poussins témoins non vaccinés du même âge sont gardés séparément. Tous les oiseaux des deux groupes sont éprouvés 3 à 4 semaines plus tard par

les voies intranasale ou oculaire, chacun recevant $10^{3,0}$ – $10^{3,5}$ DIE_{50} de la souche virulente Massachusetts M-41. Un prélèvement par écouvillonnage de la trachée est pratiqué sur chaque oiseau 4 à 5 jours après l'épreuve et placé dans 3 ml d'un milieu de culture liquide avec antibiotiques. Chaque milieu est testé pour la recherche du VBI par inoculation (0,2 ml) de 5 œufs embryonnés âgés de 9 à 11 jours. Un autre test alternatif à ces écouvillonnages consiste à tuer les oiseaux 4 à 6 jours après l'épreuve et à examiner au microscope l'activité ciliaire des anneaux de trachée (20). Les oiseaux n'ayant pas résisté à l'épreuve présentent une perte importante de la motilité ciliaire. Les vaccins à virus vivants sont satisfaisants si au moins 90 % des poussins vaccinés et éprouvés ne montrent pas la présence du VBI dans leur trachée alors que 90 % ou plus des poussins témoins montrent la présence du virus.

Pour évaluer un vaccin à virus inactivé destiné à protéger des poules pondeuses, au moins 30 poussins EAPS sont vaccinés à la dose préconisée à l'âge le plus jeune recommandé pour cette vaccination. Si une primovaccination avec un vaccin à virus vivant est d'abord effectuée, un groupe supplémentaire d'oiseaux reçoit seulement le vaccin à virus vivant. Dans les deux cas, ces primovaccinations ne doivent pas être faites au delà de l'âge de 3 semaines. Le vaccin à virus inactivé est administré 4 à 6 semaines après la primovaccination avec le vaccin à virus vivant. Un autre groupe de 30 oiseaux témoins non-vaccinés est prévu parallèlement. Tous les groupes sont hébergés séparément jusqu'à 4 semaines avant le pic de la production des œufs puis ils sont réunis dans le même bâtiment. La production individuelle en œufs est surveillée et lorsqu'elle devient régulière tous les oiseaux sont éprouvés, la surveillance de la production d'œufs étant prévue encore pendant 4 semaines. L'épreuve doit être suffisante pour assurer une baisse du taux de ponte pendant les 3 semaines suivant l'intervention. La baisse du taux de ponte du groupe témoin doit être au moins de 67 %. Le groupe recevant le vaccin à virus vivant en primovaccination suivi d'un rappel avec le vaccin à virus inactivé doit rester au taux précédent et le groupe ne recevant que la primovaccination doit montrer un taux intermédiaire de baisse de la production. Les sérums collectés chez tous les oiseaux au moment de la vaccination, 4 semaines plus tard et au moment de l'épreuve doivent être négatifs chez les oiseaux témoins.

Pour évaluer un vaccin à virus inactivé destiné à protéger des oiseaux contre la maladie respiratoire, 20 poulets EAPS âgés de 4 semaines sont vaccinés selon les recommandations du fabricant. Un autre groupe de 20 oiseaux du même âge et de même origine est hébergé avec ce premier groupe. La réponse humorale est déterminée 4 semaines plus tard ; il ne doit pas y avoir de réponse immunitaire chez les oiseaux témoins. Tous les oiseaux sont éprouvés avec 10^3 DIP_{50} (Dose de virus infectant 50 % des poussins) de virus virulent, tués 4 à 7 jours plus tard et les sections de trachée sont examinées pour leur motilité ciliaire. Au moins 80 % des témoins non-vaccinés doivent présenter une ciliostase complète alors qu'un même pourcentage d'oiseaux vaccinés doit montrer qu'il n'a pas été affecté.

Des vaccins, à virus vivant comme à virus inactivé, contenant les valences maladie de Newcastle, bursite infectieuse, réovirose et syndrome chute de ponte 76 (RDS76) sont disponibles dans certains pays. L'efficacité de ces différentes valences vaccinales doit être établie indépendamment puis sur l'association au cas où il existerait une éventuelle interférence entre ces différents antigènes.

2. Méthodes de fabrication

Toutes les souches virales destinées aux vaccins à virus vivants sont cultivées dans le sac allantoïdien d'œufs embryonnés de poulets EAPS ou sur cultures cellulaires appropriées. Pour les vaccins à virus inactivés, les œufs de poules issues d'élevages non EAPS peuvent être utilisés. Le mélange récolté est clarifié puis titré pour son infectiosité. Pour les vaccins à virus vivants, ce liquide est lyophilisé dans des ampoules alors que pour les vaccins à virus inactivés il est mélangé à une huile minérale de haute qualité pour former une émulsion à laquelle un conservateur est ajouté.

3. Contrôle en cours de fabrication

Le contrôle du titre en antigène requis est basé sur les tests initiaux pratiqués sur les lots de vaccins prouvant leur efficacité dans des essais au laboratoire et sur le terrain. Les titres infectieux sont évalués sur des embryons de poulet.

Les vaccins à virus vivants ne doivent pas contenir moins de $10^{3,5}$ DIE_{50} par dose pour un oiseau jusqu'à la date d'expiration indiquée, et pas moins de $10^{2,5}$ DIE_{50} par dose pour un oiseau après une incubation à 37 °C pendant 7 jours à la fin de l'observation. Pour les vaccins à virus inactivés, le fabricant doit démontrer l'efficacité de l'inactivation de l'agent et du procédé d'inactivation à la fois pour le virus BI et les contaminants potentiels. Avec l'utilisation de la bêta-propiolactone ou du formol, tous les virus leucosiques vivants et toutes les espèces de *Salmonella* doivent être éliminés ; et, avec les autres agents utilisés pour l'inactivation, tous les contaminants potentiels doivent être inactivés. Avant les procédés d'inactivation, il est important de vérifier l'homogénéité des suspensions et le test d'inactivation doit être réalisé sur chaque lot récolté en vrac après inactivation et sur le produit fini.

Les tests d'inactivation doivent être appropriés au vaccin concerné et consistent à effectuer deux passages sur cultures cellulaires, sur œufs embryonnés ou sur poussins, en inoculant 0,2 ml et en renouvelant 10 fois par passage.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Chaque lot de vaccin à virus vivant doit être contrôlé pour l'absence de contamination comme pour le virus de semence (voir le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »).

b) Innocuité

• Pour les vaccins à virus vivants

Utiliser au moins 10 poulets EAPS ayant l'âge minimal requis pour la vaccination comme indiqué sur la notice du vaccin. Administrer par instillation oculaire à chaque poulet 10 doses de vaccin reconstitué de manière à obtenir une concentration adaptée à ce test. Observer les poulets pendant 21 jours. Pour les vaccins indiqués pour les poulets âgés de 2 semaines ou plus, utiliser les poulets inoculés dans « le test pour les agents étrangers utilisant les poulets » (voir Section C.1.c.4). Si, pendant la période d'observation, plus de 2 poulets meurent d'une cause non attribuable au vaccin, répéter le test. Le vaccin est satisfaisant pour ce test si les poulets ne présentent pas de signes cliniques graves, en particulier des signes respiratoires et qu'aucun poulet ne meure d'une cause attribuable au vaccin.

• Pour les vaccins à virus inactivés

Injecter une double dose de vaccin par la voie recommandée par le fabricant à chacun des 10 poulets EAPS âgés de 14 à 28 jours. Observer les poulets pendant 21 jours. Il faut vérifier qu'il n'y a aucune réaction anormale locale ou systémique.

c) Activité

Le test d'activité est établi à partir des résultats des tests d'efficacité réalisés sur le lot de semence primaire. Les tests d'activité des vaccins à virus vivants sont réalisés par le titrage de l'infectiosité et pour les vaccins à virus inactivés, ces tests consistent à mesurer la production d'anticorps. Le test d'activité du lot de vaccin à virus inactivé consiste à vacciner 20 poulets EAPS âgés de 4 semaines et à montrer que leur titre moyen par le test d'IHA n'est pas inférieur à 6 log₂, 4 semaines plus tard.

d) Durée de l'immunité

Le vaccin doit montrer qu'il présente l'activité requise pour atteindre la durée d'immunité revendiquée à la fin de la durée de conservation.

e) Stabilité

Au moins 3 lots doivent être testés pour leur stabilité et doivent donner des résultats satisfaisants 3 mois au delà de la durée de conservation mentionnée.

La stabilité du vaccin à virus vivant doit être mesurée par le maintien d'un titre infectieux satisfaisant.

La stabilité du vaccin à virus inactivé est mesurée à des intervalles réguliers lors des tests d'efficacité des lots. La concentration du conservateur et la persistance de la durée de conservation doivent être vérifiées. Il ne doit pas exister de modifications physiques du vaccin et l'émulsion initiale doit être retrouvée après une rapide secousse.

f) Agents de conservation

Il y a un taux maximal dans les conditions d'emploi des antibiotiques, des agents de conservation ou des agents résiduels utilisés pour l'inactivation.

g) Précautions et mise en garde

Le virus BI n'est pas connu pour présenter un danger quelconque pour le personnel préparant les vaccins ou les testant. Cependant certains agents étrangers peuvent être nocifs et les premières étapes dans l'emploi du lot de semence doivent être réalisées dans un local sécurisé. Il s'agit de prendre la plus grande précaution dans toutes les productions de vaccins pour diminuer le risque d'exposition du personnel à des

aérosols de protéines étrangères. Les personnes allergiques aux œufs ne doivent pas être employées pour ce travail.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Un test d'innocuité doit être réalisé sur chaque lot du produit fini, comme indiqué dans la Section C.4.b.

b) Activité

Un test d'activité doit être réalisé sur chaque lot du produit fini, comme indiqué dans la Section C.4.c, chez le fabricant et à la fin de la période de conservation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALEXANDER D.J., ALLAN W.H., BIGGS P.M., BRACEWELL C.D., DARBYSHIRE J.H., DAWSON P.S., HARRIS A.H., JORDAN F.T., MACPHERSON I., MCFERRAN J.B., RANDALL C.J., STUART J.C., SWARBRICK O. & WILDING G.P. (1983). A standard technique for haemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Vet. Rec.*, **113**, 64.
2. ALEXANDER D.J., GOUGH R.E. & PATTISON M. (1978). A long-term study of the pathogenesis of infection of fowls with three strains of avian infectious bronchitis virus. *Res. Vet. Sci.*, **24**, 228–233.
3. BHATTACHARJEE P.S., NAYLOR C.J. & JONES R.C. (1994). A simple method for immunofluorescence staining of tracheal organ cultures for the rapid identification of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, **23**, 471–480.
4. CASAIS R., DOVE B., CAVANAGH D. & BRITTON P. (2003). A recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *J. Virol.*, **77**, 9084–9089.
5. CAVANAGH D. (1991). Sequencing approach to IBV antigenicity and epizootiology. *In: Proceedings of the Second International Symposium on Infectious Bronchitis*. Rauischholzhausen, Germany, June 1991, 147–160.
6. CAVANAGH D. (2003). Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.*, **32**, 567–582.
7. CAVANAGH D., DAVIS, P.J. & COOK J.K.A. (1992). Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Pathol.*, **21**, 401–408.
8. CAVANAGH D., MAWDITT K., BRITTON P. & NAYLOR C.J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.*, **28**, 593–605.
9. CAVANAGH D., MAWDITT K., SHARMA M., DRURY S.E., AINSWORTH H.L., BRITTON P. & GOUGH R.E. (2001). Detection of a coronavirus from turkey poult in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Pathol.*, **30**, 355–368.
10. CAVANAGH D., MAWDITT K., WELCHMAN D. DE B., BRITTON P. & GOUGH R.E. (2002). Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. *Avian Pathol.*, **31**, 81–93.
11. CAVANAGH D. & NAQI S. (2003). Infectious bronchitis. *In: Diseases of Poultry*, 11th Edition. Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D.E., eds. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, 101–119.
12. CLARKE J.K., MCFERRAN J.B. & GAY F.W. (1972). Use of allantoic cells for the detection of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **36**, 62–70.
13. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (Interim Publication Nov. 1993). The Rules Governing Medicinal Products in the European Community. Volume VII: Guidelines for the Testing of Veterinary Medicinal Products.
14. COUNCIL OF EUROPE (1997). European Pharmacopoeia, Third Edition. Vaccinum bronchitidis infectivae aviariae vivum cryodesiccatum. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 1795–1796.

15. COUNCIL OF EUROPE (1997). European Pharmacopoeia, Third Edition. Vaccinum bronchitidis infectivae aviariae inactivatum. Council of Europe, Strasbourg, France, 1745–1746.
16. COOK J.K.A. (1984). The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathol.*, **13**, 733–741.
17. COOK J.K.A., DARBYSHIRE J.H. & PETERS R.W. (1976). The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Virol.*, **50**, 109–118.
18. COOK J.K.A., ORBELL S.J., WOODS M.A. & HUGGINS M.B. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.*, **28**, 477–485.
19. CSERMELYI M., THIJSEN R., ORTHIEL F., BURGER A.G., KOUWENHOVEN B. & LUTTICKEN D. (1988). Serological classification of recent infectious bronchitis virus isolates by the neutralisation of immunofluorescent foci. *Avian Pathol.*, **17**, 139–148.
20. DARBYSHIRE J.H. (1985). A clearance test to assess protection in chickens vaccinated against avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, **14**, 497–508.
21. DARBYSHIRE J.H., COOK J.K.A. & PETERS R.W. (1978). Growth comparisons of avian infectious bronchitis virus strains in organ cultures of chicken tissues. *Arch. Virol.*, **56**, 317–325.
22. DARBYSHIRE J.H., ROWELL R.G., COOK J.K.A. & PETERS R.W. (1979). Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralisation tests in tracheal organ cultures. *Arch. Virol.*, **61**, 227–238.
23. DAWSON P.S. & GOUGH R.E. (1971). Antigenic variation in strains of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **34**, 32–39.
24. DE WITT J.J. (2000). Technical review. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, **29**, 71–93.
25. GELB J., JR., ROSENBERGER J.K., FRIES P.A., CLOUD S.S., ODOR E.M., DOHMS J.D. & JAEGER J.S. (1989). Protection afforded infectious bronchitis virus-vaccinated sentinel chickens raised in a commercial environment. *Avian Dis.*, **33**, 764–769.
26. GELB J., JR., WEISMAN Y., LADMAN B.S. & MEIR R. (2005). S1 gene characteristics and efficacy of Vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996–2000). *Avian Pathol.*, **34**, 194–203.
27. GELB J., JR., WOLFF J.B. & MORAN C.A. (1991). Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Dis.*, **35**, 82–87.
28. HOFSTAD M.S. (1958). Antigenic differences among isolates of avian infectious bronchitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, **19**, 740–743.
29. HOPKINS S.R. (1974). Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque purified isolates. *Avian Dis.*, **18**, 231–239.
30. IGNJATOVIC J., MCWATERS P. & GALLI L. (1991). Antigenic relationship of Australian infectious bronchitis viruses: analysis using polyclonal and monoclonal antibodies. In: Proceedings of the Second International Symposium on Infectious Bronchitis. Rauschholzhausen, Germany, June 1991, 161–167.
31. IGNJATOVIC J. & SAPATS S. (2000). Avian infectious bronchitis virus. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **19** (2), 493–508.
32. JACKWOOD M.W., KWON H.M. & HILT D.A. (1992). Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. *Avian Dis.*, **36**, 403–409.
33. JACKWOOD M.W., YOUSEF N.M. & HILT D.A. (1997). Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, **41**, 105–110.
34. KARACA K., NAQI S.A. & GELB J. JR (1992). Production and characterisation of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Dis.*, **36**, 903–915.
35. KEELER C.L., REED K.L., NIX W.A. & GELB J. (1998). Serotype identification of avian infectious bronchitis virus (IBV) by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. *Avian Dis.*, **42**, 275–284.

36. KING D.J. & HOPKINS S.R. (1984). Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the haemagglutination inhibition test. *Avian Dis.*, **28**, 727–733.
37. KINGHAM B.F., KEELER C.L. JR, NIX W.A., LADMAN B.S. & GELB J. JR (2000). Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S-1 gene. *Avian Dis.*, **44**, 325–335.
38. KOCH G., HARTOG L., KANT A., VAN ROOZELAAR D. & DE BOER G.F. (1986). Antigenic differentiation of avian bronchitis virus variant strains employing monoclonal antibodies. *Israel J. Vet. Med.*, **42**, 80–97.
39. KOCH G., KANT A., COOK J.K.A. & CAVANAGH D. (1992). Location of antigenic sites defined by neutralising monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. *J. Gen. Virol.*, **73**, 591–596.
40. KUSTERS J.G., NIESTERS H.G.M., LENSTRA J.A., HORZINEK M.C. & VAN DER ZEIJST B.A.M. (1989). Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virology*, **169**, 217–221.
41. KWON H.M., JACKWOOD M.W., & GELB J., JR. (1993). Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.*, **37**, 194–202.
42. MOCKETT A.P.A. & DARBYSHIRE J.H. (1981). Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, **10**, 1–10.
43. NAQI S.A. (1990). A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. *Avian Dis.*, **34**, 893–898.
44. RUANO M., EL-ATTRACHE J. & VILLEGAS P. (2000). A rapid-plate hemagglutination assay for the detection of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, **44**, 99–104.
45. SCHULTZE B., CAVANAGH D. & HERRLER G. (1992). Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a haemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes. *Virology*, **189**, 792–794.
46. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) (1 January, 1994). Code of Federal Regulations. § 113. 327 Bronchitis Vaccine. US Government Printing Office, Washington, D.C., USA

(http://a257.g.akamaitech.net/7/257/2422/14mar20010800/edocket.access.gpo.gov/cfr_2003/9cfr113.327.htm)
47. WAKENELL P.S., SHARMA J.M. & SLOCOMBE R.F. (1995). Embryo vaccination of chickens with infectious bronchitis virus: histologic and ultrastructural lesion response and immunologic response to vaccination. *Avian Dis.*, **39**, 752–765.
48. WITTER R.L. (1962). The diagnosis of infectious bronchitis of chickens by the agar gel precipitin test. *Avian Dis.*, **6**, 478–492.
49. YU L., JIANG Y., LOW S., WANG Z., NAM S.J., LIU W. & KWANG J. (2001). Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis.*, **45**, 416–424.
50. ZWAAGSTRA K.A., VAN DER ZEIJST B.A.M. & KUSTERS J.G. (1992). Rapid detection and identification of avian bronchitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 79–84.

*
* *

LARYNGOTRACHÉITE INFECTIEUSE AVIAIRE

RÉSUMÉ

La laryngotrachéite infectieuse aviaire (LTI) est une maladie respiratoire due à un Herpesviridae, Alphaherpesvirinae, Gallid herpesvirus 1. Il s'agit principalement d'une maladie de la poule bien que le faisan, la perdrix et le paon soient aussi affectés. Les symptômes et les lésions peuvent varier d'une atteinte très sévère où certains oiseaux meurent d'asphyxie, à une forme très atténuée difficile à différencier d'une autre maladie respiratoire bénigne chez des poulets. La lésion principale est une trachéite. Chez les oiseaux infectés, le virus peut rester à l'état latent et être excrété plus tard sans aucune manifestation clinique.

Le diagnostic au laboratoire correspond à l'isolement du virus, à la mise en évidence du virus ou de l'antigène viral et de la détection des anticorps spécifiques dans le sérum. L'observation d'inclusions intranucléaires dans la trachée lors d'un examen histopathologique permet également le diagnostic.

Identification de l'agent pathogène : *l'isolement du virus doit être effectué par l'inoculation du matériel suspect sur la membrane chorioallantoïdienne d'œufs embryonnés ou sur cultures cellulaires issues d'embryon de poulet. Ces méthodes demandent du temps mais sont sensibles. Les méthodes rapides sont l'examen direct en microscopie électronique d'un exsudat trachéal, une immunofluorescence sur exsudat trachéal ou coupes congelées de trachée, l'immunodiffusion en gélose (IDG) pour détecter les antigènes viraux sur des prélèvements de trachée ou sur du matériel venant d'un œuf infecté, et la méthode immuno-enzymatique (ELISA) pour détecter l'antigène viral dans les raclements de la muqueuse trachéale. L'amplification en chaîne par polymérase (PCR) s'est révélée plus sensible que l'isolement du virus pour l'examen des prélèvements et elle est à l'heure actuelle largement utilisée. La caractérisation du virus et la différenciation entre les souches sauvages et les souches vaccinales sont possibles grâce à une PCR suivie d'une analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction.*

Épreuves sérologiques : *les anticorps dirigés contre le virus LTI (ILTV pour infectious laryngotracheitis virus) peuvent être détectés par les tests de séroneutralisation (SN) réalisés sur œufs ou cultures cellulaires, ou par des réactions d'IDG, d'immunofluorescence indirecte, ou ELISA. Cette dernière technique est préférée lors de campagnes de dépistage des élevages.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *les vaccins contre la LTI sont habituellement préparés à partir de virus vivant atténué. Les vaccins commercialisés procurent un certain degré de protection, mais ne sont pas complètement satisfaisants. Des études récentes sur l'efficacité de vaccins génétiquement modifiés ont donné des résultats prometteurs.*

A. INTRODUCTION

La laryngotrachéite infectieuse aviaire (LTI) est une maladie respiratoire de la poule due à un *Alphaherpesvirus*. Elle peut aussi affecter le faisan, la perdrix et le paon. Dans sa forme virulente, cette maladie est caractérisée par son historique, les symptômes et des lésions trachéales très sévères alors que la forme atténuée est difficile à différencier des autres maladies respiratoires bénignes. Le diagnostic au laboratoire dépend de la mise en évidence du virus ou d'antigènes viraux (9, 24, 29) ou encore des anticorps sériques spécifiques (1, 20).

Cliniquement, la maladie peut apparaître sous trois formes, dénommées suraiguë, subaiguë et chronique ou bénigne. Dans la forme suraiguë, la maladie apparaît soudainement et se propage rapidement. Le taux de morbidité est élevé et le taux de mortalité peut dépasser 50 %. Quelques oiseaux peuvent mourir subitement (avec un aspect de bonne condition physique) avant l'apparition des signes cliniques caractéristiques comprenant des difficultés respiratoires avec le cou restant tendu et de la suffocation lors des tentatives d'inspiration. On

observe aussi des gargouillements, des râles et de la toux lorsque les oiseaux essaient d'expulser le matériel obstruant la trachée. Des caillots sanguins peuvent être ainsi expulsés et retrouvés sur le sol ou les murs du bâtiment. Les lésions sont limitées au tractus respiratoire supérieur et elles sont aussi caractéristiques, consistant en une trachéite hémorragique avec des caillots sanguins, une rhinite mucoïde et du mucus teinté de sang le long de la trachée.

Dans la forme subaiguë, le début de la maladie est plus lent et les symptômes respiratoires peuvent évoluer sur quelques jours avant l'observation d'une mortalité. Le taux de morbidité est élevé, mais celui de la mortalité est plus faible que dans la forme subaiguë, entre 10 % et 30 %. Les lésions sont moins sévères et correspondent à un exsudat mucoïde avec ou sans présence de sang dans la trachée. On peut observer des membranes diphtéroïdes caséeuses jaunâtres adhérentes au larynx et à la muqueuse trachéale en partie supérieure.

La LTI chronique ou bénigne peut être observée chez les oiseaux survivants de l'une des formes précédentes de la maladie, bien que quelques foyers puissent apparaître d'emblée uniquement bénins. L'incidence de la LTI chronique dans un élevage peut n'être que de 1 à 2 %, avec la plupart des oiseaux mourant de suffocation. Les symptômes comprennent des accès de toux et des difficultés respiratoires, avec des écoulements par le nez et la bouche, et une diminution de la production des œufs. L'infection est contractée via les voies respiratoires supérieures et la transmission se réalise le plus facilement à partir des oiseaux en phase aiguë d'infection, cependant des infections inapparentes peuvent persister longtemps avec des ré-excrétions intermittentes de virus ; les oiseaux guéris mais porteurs du virus constituent également une source potentielle de transmission de la maladie (12). Les lésions observées sont localisées à la trachée, le larynx et la cavité buccale, avec la présence de dépôts nécrotiques caséeux et diphtéroïdes en plaques ou en amas. La survenue d'une LTI bénigne peut atteindre un grand nombre d'oiseaux simultanément avec pour seules lésions majeures une conjonctivite, une sinusite et une trachéite mucoïde. Etant donné que la transmission de la LTI s'effectue par contact étroit, la transmission est plus lente dans les cages que dans les élevages en liberté et la progression de l'infection dans un bâtiment avec cages peut être évidente. Des travaux récents ont confirmé les variations considérables qui existent entre les souches de ILTV en ce qui concerne leur tropisme pour la trachée ou la conjonctive ; les souches ayant une affinité particulière pour la conjonctive peuvent entraîner de sévères pertes de poids (18).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Le virus peut être isolé sur cultures de cellules de foie (19) ou de rein (6) d'embryon de poulet ou encore de reins de poulet (26). Parmi celles-ci les cultures de cellules embryonnaires hépatiques sont les plus sensibles (11). Le virus peut aussi être cultivé par passage sur la membrane chorioallantoïdienne (MCA) d'embryons de poulet exempts d'agents pathogènes spécifiques (EAPS) âgés de 10 à 12 jours (14).

Le virus causal peut être mis en évidence directement dans un exsudat trachéal par microscopie électronique (26). Les antigènes viraux peuvent être détectés par immunofluorescence (4, 28), immunodiffusion en gélose (IDG) (15), ou une méthode immuno-enzymatique (ELISA), sur des raclements de la muqueuse trachéale (30). L'examen histopathologique de la trachée avec l'observation des inclusions intranucléaires caractéristiques des herpèsvirus peut être aussi utile (3, 23). Les méthodes utilisant l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) pour détecter le LTIV ont été décrites, la PCR étant considérée généralement plus sensible que l'isolement du virus (2, 16, 19, 29).

a) Isolement du virus

Lorsque les prélèvements sont effectués sur des oiseaux vivants pour l'isolement viral, les écouillons trachéaux sont préférables aux écouillons oropharyngés ou conjonctivaux. Ils doivent être placés dans un milieu de transport additionné d'antibiotiques. Lorsque la maladie est chronique, le choix des prélèvements pour l'isolement du virus doit être effectué sur un animal euthanasié au début des signes cliniques plutôt que de tenter cet isolement chez un oiseau mort à la suite d'une asphyxie après une longue évolution. La qualité du prélèvement est meilleure si l'oiseau est tué par injection de barbituriques ou autres produits plutôt que par dislocation cervicale. Il faut prélever la tête entière et le cou des animaux morts ou seulement la trachée et le larynx après leur prélèvement en évitant au maximum toute contamination. Les trachées doivent être transportées dans un milieu additionné d'antibiotiques, mais emballées dans un papier humide si elles sont destinées à la microscopie électronique. Tout stockage prolongé des tissus infectés doit être réalisé à -70 °C ou moins pour limiter une perte du titre viral. Il faut éviter les congélations et décongélations répétées qui diminuent l'infectiosité du virus.

L'exsudat et les cellules épithéliales raclés de la trachée sont dilués au 1/5 dans un milieu nutritif contenant de la pénicilline et de la streptomycine, le mélange étant agité vigoureusement. La suspension obtenue est centrifugée à faible vitesse pour enlever les débris, puis 0,1 ml du liquide surnageant est inoculé sur la MCA

d'au moins 3 œufs embryonnés de poulet âgés de 10 à 12 jours. Les œufs sont obturés avec de la paraffine et mis à incuber à 37 °C pendant plus de 7 jours. Ils sont mirés tous les jours puis l'on recherche les foyers nécrotiques typiques sur les MCA des embryons morts ou survivants au-delà de 7 jours. Alternativement, on peut utiliser des cultures cellulaires de foie ou de rein d'embryon de poulet. Lorsque le tapis cellulaire est complet, le milieu est éliminé puis les cellules sont inoculées et mises en contact pour adsorber le virus pendant 1 à 2 h. Puis les cultures sont recouvertes d'un nouveau milieu et mises en incubation jusqu'à 7 jours en étant examinées tous les jours au microscope dans le but de mettre en évidence un effet cytopathogène (ECP) caractérisé par l'apparition de cellules syncytiales.

Dans chaque cas, 3 passages de matériel biologique au moins sont nécessaires avant de considérer qu'un prélèvement est négatif. L'isolement d'un virus LTI peut être confirmé par un test de séroneutralisation (SN) sur œufs ou sur culture cellulaire en utilisant un antisérum LTI hyperimmun. Alternativement, des particules virales peuvent être identifiées rapidement dans le liquide de cultures cellulaires ou sur les foyers nécrotiques des MCAs par microscopie électronique et l'antigène viral peut être détecté par immunofluorescence sur des cultures cellulaires infectées fixées avec de l'acétone ou sur des coupes congelées de MCA ; l'acide nucléique du virus peut être détecté par PCR.

b) Microscopie électronique

Le virus peut être mis en évidence par microscopie électronique à partir d'un raclage de trachée ou d'un exsudat trachéal étalé et mélangé avec quelques gouttes d'eau distillée sur une lame pour microscopie. Une goutte de cette suspension est placée sur un carbone et une grille porte-objet préalablement enduite d'un film continu de formvar, laissée pendant 2 min puis l'excès de liquide est retiré avec du papier filtre. Une goutte d'acide phosphotungstique à 4 % de pH 6,4 est ajoutée puis, après 3 min, l'excès de liquide est éliminé. La grille est séchée minutieusement puis examinée au microscope électronique à un grossissement de $\times 30$ à 45 000 pour les particules caractéristiques des herpesvirus (100 nm de diamètre avec une symétrie icosaédrique).

c) Immunofluorescence

Pour les épreuves d'immunofluorescence pour les antigènes viraux, les cellules épithéliales obtenues par raclage de trachée sont étalées sur une lame de verre. Alternativement des coupes de trachée d'une épaisseur de 5 μm obtenues par congélation rapide avec de l'azote liquide sont fixées dans l'acétone à la température du laboratoire pendant 10 min. Ces prélèvements peuvent être colorés directement en utilisant des immunoglobulines anti-ILTV marquées par de l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF) appliquées pendant 1 h, suivi d'un rinçage pendant 15 min dans un bain d'une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) à pH 7,2, sous agitation magnétique. Sinon, ils peuvent être colorés indirectement en utilisant un sérum de poulet anti-ILTV de dilution appropriée appliqué pendant 1 h. La lame est rincée minutieusement avec du PBS pendant 15 min comme ci-dessus et les immunoglobulines anti-ILTV marquées par de l'ICTF sont appliquées pendant 30 min. Après un dernier rinçage, la préparation est recouverte d'une lamelle avec un milieu de montage non coloré. Les préparations sont examinées à l'aide d'un microscope à fluorescence sous lumière ultra-violette pour rechercher une fluorescence spécifique intranucléaire dans les cellules épithéliales. Des témoins appropriés sont effectués en utilisant du matériel de référence non infecté et, pour les méthodes indirectes, du sérum de poulet négatif. Des précautions particulières doivent être prises lors de la lecture des préparations pour l'immunofluorescence car des IgG endogènes de poulet dans la trachée peuvent provoquer une fixation non souhaitée des immunoglobulines anti-virus LTI marquées par de l'ICTF.

d) Immunodiffusion en gélose

Les antigènes du ILTV peuvent être mis en évidence sur un exsudat trachéal, les MCAs infectées et des cultures cellulaires infectées en utilisant de l'antisérum hyperimmun anti-ILTV. La gélose est préparée avec de la gélose Noble agar (1,5 %) contenant du chlorure de sodium (8 %) et de l'azide de sodium (0,02 %) - en tant que conservateur - dans de l'eau distillée. Les ingrédients sont autoclavés à 2,4 bars pendant 15 min ; 5 ml de la gélose liquide sont versés dans une boîte de Petri de 5 cm de diamètre. Quand la gélose est figée, une série de puits sont réalisés dans la gélose. Les puits ont habituellement 8 mm de diamètre et 4 mm d'intervalle. Le sérum hyperimmun est placé avec une pipette dans le puits central alors que les puits qui l'entourent sont remplis avec les prélèvements suspects d'être virulents à tester, à l'exception d'un puits témoin positif contenant l'antigène viral. Les disques sont ensuite mis en incubation en atmosphère humide à la température du laboratoire ou à 37 °C, puis examinés 24 à 48 h plus tard en lumière oblique pour identifier les lignes de précipitation. Les tests doivent aussi comporter un témoin antigène négatif avec du matériel non infecté et un antisérum témoin négatif. Pour des raisons économiques, ce test peut être réalisé sur une lame de microscope recouverte d'une fine couche de gélose où les trous ont 4 mm de diamètre et 2 mm d'intervalle.

e) Méthode immuno-enzymatique

La méthode ELISA utilisant les anticorps monoclonaux (AcM) peut être employée pour mettre en évidence les antigènes viraux (16). L'exsudat trachéal est mélangé avec un même volume de PBS contenant 1 % (v/v) de détergent comme le Nonidet P40 (BDH Chemicals, Poole, Royaume-Uni), puis mixé pendant 30 s et centrifugé à 10 **g** pendant 1 min. Le liquide surnageant est distribué sous un volume de 50 µl dans les cupules des microplaques préalablement recouvertes d'IgG de lapin anti-ILTV diluées au 1/200 dans 0,05 M de tampon carbonate/bicarbonate, de pH 9,0 ; et mis en incubation pendant 1 h. Puis 50 µl d'AcM dirigés contre les principales glycoprotéines du ILTV, dilués au 1/50 dans du PBS, sont ajoutés dans chaque cupule, suivis par 50 µl d'une dilution au 1/1 000 d'IgG anti-souris purifiée d'origine caprine conjuguée à de la peroxydase de raifort. Le substrat, l'acide 5-aminosalicylique (6,5 mM), est ajouté dans les cupules au volume de 100 µl. Après 30 min, les plaques sont lues à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm et la lecture de l'absorbance pour chaque cupule est corrigée par la soustraction de la lecture obtenue avec les cupules témoins contenant du tampon dilué au lieu de l'exsudat trachéal. La limite positif/négatif est déterminée par la valeur moyenne de l'absorbance obtenue avec plusieurs prélèvements négatifs (matériel trachéal sans virus LTI) plus 3 écart-types.

f) Histopathologie

Les trachées destinées à un examen histologique doivent être placées dès leur prélèvement sur les oiseaux dans une solution de formol et incluses dans des blocs de paraffine. Les paupières et les poumons sont parfois examinés. Des inclusions Intranucléaires peuvent être observées dans les cellules de l'épithélium trachéal sur des coupes longitudinales colorées par l'hématoxyline et l'éosine. Il s'agit des inclusions classiques de type A de Cowdry des herpesviroses, mais elles peuvent n'être présentes que pendant les 3 à 5 jours suivant l'infection. Dans les cas sévères où la plupart des cellules infectées se sont détachées de la trachée, les inclusions seront visibles sur les cellules intactes dans les débris cellulaires présents dans la lumière trachéale. Des coupes longitudinales de la trachée sont préférables à des coupes transversales car elles permettent d'examiner toute la longueur de l'organe.

g) Méthodes moléculaires

Différentes méthodes moléculaires pour identifier l'ADN du ILTV dans les prélèvements ont été rapportées, mais la PCR s'est révélée la plus utile. Un test d'hybridation Dot Blot avec des fragments ADN de virus cloné s'est révélé très sensible pour la détection du virus alors que l'ELISA était négatif (16, 17). Humberd *et al.* (13), ont montré que l'ADN du ILTV pouvait être détecté grâce à une PCR nichée dans des tissus inclus dans de la paraffine, en présence ou non de cellules syncytiales, d'inclusions intra-nucléaires ou des deux.

La PCR s'est révélée plus sensible que l'isolement viral dans les prélèvements, en particulier lorsque d'autres contaminants viraux comme les adénovirus sont présents (29). Alexander et Nagy (2) ont montré que la PCR et l'isolement viral présentent la même sensibilité du milieu de la phase d'infection jusqu'à la fin de celle-ci, alors que la PCR se révèle supérieure pendant la phase de guérison.

Jusqu'à présent, le problème avec la PCR était qu'elle ne pouvait pas différencier les souches du terrain des souches vaccinales. Cependant la combinaison de la PCR et de l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) d'un ou de plusieurs gènes ou régions du génome viral a permis la caractérisation de souches différentes dans un pays ou une région (5). Plusieurs études ont montré que si certaines souches de terrain sont étroitement apparentées aux souches vaccinales et qu'il est probable qu'elles dérivent de ces dernières, d'autres sont « d'authentiques types sauvages » (21). Les gènes habituellement analysés par différents auteurs comprennent *ICP4*, *TK* (thymidine kinase), *gG* (glycoprotéine G), *gE* (glycoprotéine E) et *UL47*. Oldoni & Garcia (22) ont utilisé 36 enzymes de restriction tandis que d'autres auteurs en ont utilisé que 4.

i) Protocole de la PCR

Dans un protocole classique de PCR pour l'ILTV, l'ADN viral est extrait d'échantillons cliniques (écouvillons, fragments de tissu), de lésions de la membrane chorio-allantoïque, de surnageants de culture ou de vaccins à l'aide de kit d'extraction d'ADN. Les amorces qui peuvent être utilisées ont été indiquées dans des travaux précédemment publiés ou peuvent être construites sur la base des séquences de ILTV inscrites dans la base de données internationale Genbank. Les amplifications sont faites en utilisant la Taq ADN polymérase. Les réactions d'amplification classiques commencent par une étape initiale de dénaturation à 94 °C pendant 1 min suivie par 35 cycles d'amplification à 94 °C pendant 1 min avec des températures d'hybridation comprises entre 54 °C et 60 °C pendant 30 s. L'étape d'élongation peut être réalisée à 68 °C pendant des durées variant selon la taille de la région cible qui est amplifiée, et une phase finale d'élongation à 68 °C pendant 7 min. Le produit de la PCR est visualisé après une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 %, coloration au bromure d'éthidium et exposition aux rayons ultraviolets.

ii) *PCR en temps réel*

Une épreuve de PCR en temps réel a récemment été décrite pour l'ILTV (7). Elle présente l'avantage, d'être réalisable en moins de 2 h (amplification et analyse compris). Comparée aux autres techniques telles que l'isolement du virus ou la PCR classique suivie d'une électrophorèse en gel, elle donne donc des résultats très rapidement.

iii) *Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)*

Plusieurs endonucléases de restriction ont été décrites pour réaliser des analyses RFLP des produits de PCR de l'ILTV, et plusieurs gènes ont été ciblés par les digestions. Il s'agit des gènes *ICP4*, *TK* (thymidine kinase), *UL15*, *UL47*, *Gg* (glycoprotéine G) et *ORF-BTK*. Les produits d'amplification sont digérés séparément avec 10 u d'une endonucléase de restrictions pendant 3 h. Les fragments digérés sont séparés dans des gels de polyacrylamide à 15 %. Ces fragments sont observés après coloration argentique de l'ADN et analysés dans une boîte lumineuse. Les différences de profils sont enregistrées pour chaque enzyme et les résultats sont présentés sous forme de dendrogrammes. La combinaison de la PCR et de la RFLP ont permis de différencier les souches de terrain de ILTV des souches vaccinales (7, 10, 21, 26).

2. Épreuves sérologiques

Les anticorps dirigés contre l'ILTV dans le sérum du poulet peuvent être détectés par SN, IDG, immunofluorescence indirecte et ELISA (1).

a) Séroneutralisation

Les tests de SN sont réalisés sur des MCAs d'œufs embryonnés de poulets âgés de 9 à 11 jours, où les anticorps spécifiques doivent neutraliser la formation des foyers nécrotiques dus au ILTV. Ces tests peuvent également être effectués de manière alternative sur des cultures cellulaires où les anticorps spécifiques neutralisent l'ILTV en prévenant l'ECP. Des dilutions de sérums de raison 2 sont ajoutées à un volume égal d'une solution virale à concentration constante. Cette concentration peut être équivalente soit à 100 DIE_{50} (dose de virus infectant 50 % des embryons), soit à 100 $DICT_{50}$ (dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire). Ces mélanges sont mis en incubation à 37 °C pendant 1 h pour permettre la neutralisation virale.

Lorsque le test est réalisé sur des œufs, les mélanges virus/sérum sont inoculés par la voie chorioallantoïdienne, avec l'emploi d'au moins 5 œufs par dilution. Les œufs sont obturés puis incubés à 37 °C pendant 6 à 7 jours. Le point limite est enregistré à la plus forte dilution du sérum où l'on n'observe pas de foyers nécrotiques sur les MCAs. Quand les tests sont pratiqués sur des cultures cellulaires, les dilutions de sérums sont préparées dans des microplaques à 96 cupules, puis le virus est ajouté. Après la période nécessaire pour la neutralisation, des cellules fraîches de foie ou de rein d'embryon de poulet sont ajoutées dans chaque cupule. Les plaques sont mises en incubation à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO_2 et examinées tous les jours pour un ECP ; le point limite à 50 % est lu après environ 4 jours quand le « témoin virus » indique que 30-300 $DICT_{50}$ ont été utilisées dans ce test. Pour le test utilisant la culture cellulaire, une neutralisation du virus au 1/8 (dilution initiale) ou plus est considérée comme positive.

b) Immunodiffusion en gélose

Pour les tests d'IDG, l'antigène est préparé à partir des MCAs infectées par le virus où des cultures cellulaires infectées. Dans le premier cas, au moins 10^4 $DICT_{50}$ du ILTV sont inoculées dans la cavité allantoïdienne d'un groupe d'œufs embryonnés EAPS âgés de 10 jours. Les MCAs sont récoltées après 4 jours d'incubation et celles qui présentent de larges foyers nécrotiques sont homogénéisées puis soniquées dans un faible volume de PBS à pH 7,1. Dans l'autre cas, des cultures cellulaires de foie ou de rein d'embryon de poulet ou de cellules rénales de poulet, fortement infectées, sont mises en incubation à 37 °C jusqu'à l'obtention d'un ECP maximal. Toutes les cellules encore attachées sont grattées et récoltées dans le milieu de culture. La récolte des cultures peut être concentrée jusqu'à 100 fois par dialyse contre du polyéthylène glycol (PEG 20 000 ou PEG 30 000). Pour le test la gélose est préparée comme décrit ci-dessus pour la détection de l'antigène, mais dans ce cas c'est l'antigène de la MCA ou de la culture cellulaire qui est placé dans le puits central et les sérums à tester dans les puits périphériques. Des antisérums témoins positif et négatif sont utilisés dans ce test qui est lu après 24 à 48 h d'incubation à la température du laboratoire ou à 37 °C. Les tests d'IDG sont simples, économiques et utiles pour un dépistage de la LTI dans l'élevage mais sont moins sensibles que les autres méthodes.

c) Épreuve d'immunofluorescence indirecte

Pour les épreuves d'immunofluorescence indirecte, l'antigène est préparé sur plusieurs microcultures cellulaires infectées par le virus LTI et multipliées sur des lames multispot recouvertes de téflon. Quand l'ECP apparaît, les cultures sont fixées dans l'acétone pendant 10 min. Les dilutions du sérum à tester sont préparées dans du PBS et appliquées sur chaque microculture, les lames étant mises par la suite en incubation pendant 1 h à 37 °C. Les lames sont rincées avec du PBS comme décrit ci-dessus, égouttées

puis traitées avec une dilution appropriée d'une solution commerciale d'IgG anti-poulet préparée sur lapin et marquée par l'ICTF. Après 1 h d'incubation à 37 °C, les lames sont lavées de nouveau et des lamelles sont montées avec un milieu de montage non coloré. Elles sont examinées par épifluorescence à la lumière ultraviolette et le titre du point limite est donné par la lecture de la plus forte dilution du sérum montrant une fluorescence spécifique. Cette épreuve est plus sensible que l'IDG mais l'interprétation des résultats peut être subjective.

d) Méthode immuno-enzymatique

L'antigène pour le test ELISA est obtenu par sonication de cultures cellulaires fortement infectées et récoltées au moment où l'ECP est maximal, et il est ensuite adsorbé sur les cupules des microplaques. L'antigène témoin négatif est obtenu à partir de cultures cellulaires non infectées traitées selon la même technique. Le test consiste essentiellement à ajouter 0,1 ml de dilutions progressives au 1/10 du sérum à tester dans les cupules sensibilisées par l'antigène positif ou négatif. Après une incubation à 37 °C pendant 2 h, les plaques sont lavées 4 fois et un sérum anti-poulet préparé sur lapin et conjugué à une peroxydase est ajouté à la dilution 1/4 000. Après une incubation à 37 °C pendant 1 h, les plaques sont de nouveau lavées 4 fois. Finalement un substrat contenant de l'acide 5-aminosalicylique est ajouté dans chaque cupule, suivi d'une solution de peroxyde d'hydrogène à la concentration finale de 0,0005 %, et l'absorbance du liquide de chaque cupule est lue au spectrophotomètre à 450 nm. Le résultat de chaque sérum est exprimé par la différence entre l'absorbance moyenne produite entre les antigènes positifs et négatifs. Le seuil limite positif/négatif est donné par la valeur moyenne de l'absorbance des sérums négatifs plus 3 écart-types. Le test est très sensible et il est possible qu'il s'agisse du meilleur test pour surveiller les élevages. La réponse humorale est détectable par ELISA entre le 7^e et le 10^e jour après infection et le pic se situe au bout de 2 semaines. La réponse au vaccin anti-LTI peut varier et il n'est pas utile de faire des tests avant le 14^e jour après vaccination. Plusieurs kits pour la détection des anticorps anti-LTI sont disponibles dans le commerce.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

La LTI est habituellement contrôlée à l'aide de vaccins à virus vivants bien que des vaccins à virus inactivés aient été aussi utilisés pour des raisons de sécurité. Des études récentes ont porté sur des vaccins élaborés génétiquement et les résultats des essais initiaux semblent prometteurs (8, 27). La souche de semence du virus vivant est une souche du ILTV suffisamment atténuée ou une souche naturellement avirulente. Les vaccins peuvent être administrés par instillation oculaire, aérosol ou dans l'eau de boisson. Lors d'une administration par aérosol, on peut provoquer la maladie en utilisant des tailles très petites pour les gouttes produites qui seront alors inhalées. Les jeunes poulets doivent être vaccinés dans les régions enzootiques, mais ils montrent souvent des réactions post-vaccinales plus sévères. Des doses répétées sont nécessaires pour obtenir une bonne protection. Le taux de virulence du virus vaccinal est critique. Les souches de faible virulence peuvent ne pas être efficaces et celles de plus grande virulence peuvent provoquer une maladie grave. L'administration du vaccin par aérosol nécessite d'être prudent sur la taille des gouttes dispersées et l'uniformité de l'application. Elle peut être plus efficace avec les souches de faible virulence mais peut devenir dangereuse avec des souches très virulentes. Actuellement les vaccins disponibles tentent de faire un compromis entre le manque d'efficacité et une innocuité réduite. En raison de la persistance d'un virus vaccinal virulent sur le terrain, il peut être difficile d'arrêter la vaccination une fois qu'elle est commencée. Des infections croisées dues au virus vaccinal et au virus du terrain chez les oiseaux vaccinés peuvent provoquer, chez les oiseaux non vaccinés en contact avec ces derniers, une maladie grave.

Des recommandations pour la production des vaccins vétérinaires sont fournies dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les recommandations fournies ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont souhaitées générales par nature et peuvent être complétées par des recommandations nationales ou régionales (par ex. réf. 25).

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Le lot de semence primaire (MSV) est sélectionné et peut être cultivé sur des œufs embryonnés de poulets EAPS ou des cultures cellulaires provenant de ces mêmes embryons. Le MSV est testée sur des embryons de poulet ou des poulets pour les critères suivants : 1) pureté, 2) *Mycoplasma* spp., 3) *Salmonella* spp., 4) virus de la leucose aviaire, 5) virus hémagglutinants, 6) identification du virus, et 7) agents pathogènes extérieurs. De plus des tests initiaux sont réalisés pour démontrer l'innocuité et l'efficacité de la souche de semence choisie. Le test d'innocuité pour le MSV doit inclure des tests montrant l'absence de réversion de la virulence après plusieurs passages en série et aussi son innocuité chez les oiseaux. On vérifie aussi l'évidence d'une excrétion et d'une propagation. Le MSV est conservée dans des aliquots à -70 °C. Le MSV

ne doit pas causer de mortalité ou une réaction respiratoire sévère chez les poulets après instillation oculaire. Les faisans sont quant à eux plus sensibles. L'administration par aérosol est pratique mais peut provoquer une maladie respiratoire sévère dans certains élevages.

b) Méthodes de culture

Pour la production en grande quantité de vaccins, le virus est multiplié sur des embryons de poulet EAPS ou des cultures cellulaires dérivées de ces mêmes embryons, jusqu'au 5^e passage à partir du MSV. Le niveau de passage acceptable est déterminé expérimentalement par le niveau de passage utilisé pour préparer le produit expérimentalement dans l'étude d'efficacité.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Un test doit être réalisé pour démontrer l'efficacité du vaccin chez les oiseaux à l'âge minimal requis pour lequel le vaccin est indiqué et aussi pour différentes espèces aviaires. Ceci est répété plus tard pour les lots de poulets pour chaque voie d'administration et/ou l'âge des oiseaux recommandés. Trois semaines plus tard (ou 10 à 14 jours aux États-Unis), les oiseaux, réunis avec dix témoins du même âge et de même origine, sont éprouvés par la voie intratrachéale ou dans le sinus orbitaire avec une souche de ILTV de forte virulence connue. Le test est satisfaisant si seulement 5 % des oiseaux vaccinés meurent ou présentent des signes sévères de LTI. Il ne doit y en avoir plus de quatre présentant des signes modérés de LTI. Au moins huit témoins doivent mourir ou présenter des symptômes graves de LTI.

2. Méthode de fabrication

Le vaccin est produit par inoculation de la souche virale de production chez des embryons de poulet âgés de 9 à 11 jours ou de cultures cellulaires préparées à partir d'embryons de poulet provenant d'élevages EAPS. Les œufs sont inoculés par un trou dans la coquille, sur la MCA. Ceux-ci sont ensuite obturés et mis en incubation à 37 °C pendant 4 à 6 jours. Tous les œufs sont mirés avant la récolte et seuls ceux qui ont des embryons vivants sont utilisés. Pour récolter le virus, les œufs sont refroidis puis nettoyés et ouverts de manière aseptique. Les MCAs et les liquides sont récoltés dans des récipients réfrigérés. Les MCAs doivent présenter les foyers de nécrose épais et grisâtres caractéristiques de l'ILTV. Les produits dérivés des cultures cellulaires doivent être préparés à partir des liquides contenant ces cultures cellulaires, qui seront ensuite mélangés et testés.

3. Contrôles en cours de fabrication

Les homogénats de tissus infectés ou de cultures cellulaires doivent être testés pour leur pureté, leur activité et leur titre en virus puis mixés avec un stabilisant (habituellement de la peptone de bœuf et du saccharose) puis lyophilisés et conservés à 4 °C.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et l'absence de contamination du matériel biologique se trouvent dans le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

En utilisant la voie d'administration recommandée, chaque lot de vaccin doit être testé chez 10 poulets EAPS ou 10 oiseaux des autres espèces cibles, en utilisant 10 doses par oiseau. Les oiseaux sont observés pendant au moins 21 jours pour observer des effets indésirables pouvant être attribués au vaccin.

c) Activité

Une fois que l'efficacité du vaccin *in vivo* a été établie, l'activité du lot peut être déterminée par la mesure du titre en virus. Des dilutions en série du vaccin sont inoculées sur la MCA d'embryons de poulet EAPS âgés de 9 à 11 jours, en utilisant au moins 7 œufs par dilution, dans un volume de 100 µl. Les œufs sont mis en incubation pendant 5 jours et le titre en virus est calculé par l'observation des lésions caractéristiques sur les MCAs. Le contenu viral doit être supérieur ou égal à la valeur annoncée lors de la fabrication et supérieur au titre prévu en fin d'expiration du produit. Tous les titres à la production et à l'expiration sont basés sur la dose minimale protectrice décrite ci-dessus.

d) Durée de l'immunité

Les résultats de la vaccination dépendront de nombreux facteurs, dont le programme des doses vaccinales et la voie d'administration. Un certain degré de protection vis-à-vis de la LTI devrait être induit sur une période de plusieurs mois.

e) Stabilité

La stabilité est testée en prenant des prélèvements du vaccin stocké à divers intervalles et par la mesure du titre en virus. Les tests devront être réalisés sur au moins 6 lots vaccinaux ou jusqu'à ce qu'un nombre statistiquement valide de séries ait été évalué et ait continué durant 3 mois après la demi-vie annoncée.

f) Agents de conservation

Les agents de conservation ne sont pas obligatoires mais quelques antibiotiques peuvent être ajoutés à la récolte des tissus ou pendant la production en série. Pour les produits sous licence aux États-Unis d'Amérique, tout antibiotique ajouté doit être signalé sur l'étiquette.

g) Précautions et mise en garde

Des précautions doivent être prises lors de la dilution et l'administration du vaccin et lors de l'élimination du vaccin non utilisé.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Aux États-Unis d'Amérique, 25 poulets sensibles sont inoculés par la voie intratrachéale et observés pendant 14 jours. Les morts sont comptabilisées en tant qu'échec. Un contrôle avec quatre échecs ou moins est considéré comme satisfaisant pour les séries. Dans l'Union Européenne, les tests sur le titre viral sont réalisés. Les titres en virus doivent normalement ne pas dépasser le $1/10^6$ de la dose considérée comme sans risque.

b) Activité

Le test sur le titre viral (voir plus haut) peut être aussi utilisé en tant que mesure d'activité. Ce titre ne doit pas être inférieur au titre minimal agréé. Chaque série ou sous-série doivent présenter un titre en virus de 10^7 supérieur à la dose minimale protectrice mais pas moins de 10^{25} DIE_{50} (ou $DICT_{50}$ pour les produits préparés sur cultures cellulaires)/dose.

c) Tests sur le produit fini

L'absence d'agents pathogènes pour le poulet doit être confirmée sur les embryons ou des poulets. Elle doit être aussi confirmée par la recherche de *Mycoplasma* spp., *Salmonella* spp., du virus de la leucose aviaire et des virus hémagglutinants.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ADAIR B.M., TODD D., MCKILLOP E.R. & BURNS K. (1985). Comparison of serological tests for the detection of antibodies to infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol.*, **14**, 461–469.
2. ALEXANDER H.S. & NAGY E. (1997). Polymerase chain reaction to detect infectious laryngotracheitis virus in conjunctival swabs from experimentally infected chickens. *Avian Dis.*, **41**, 646–653.
3. ARMSTRONG W.H. (1959). A slide smear technique for the diagnosis of laryngotracheitis. *Avian Dis.*, **3**, 80–84.
4. BRAUNE M.O. & GENTRY R.F. (1985). Standardization of the fluorescent antibody technique for the detection of avian respiratory viruses. *Avian Dis.*, **9**, 535–545.
5. CHANG P.C., LEE Y.L., SHIEN J.H. & SHIEH H.K. (1997). Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products. *J. Virol. Methods*, **66**, 179–186.
6. CHANG P.W., YATES V.J., DARDIRI A.H. & FRY D.E. (1960). Some observations of the propagation of infectious laryngotracheitis virus in tissue culture. *Avian Dis.*, **4**, 484–490.
7. CREELAN J.L., CALVERT V.M., GRAHAM D.A. & MCCULLOCH J. (2006). Rapid detection and characterisation from field cases of infectious laryngotracheitis by real-time polymerase chain reaction and restriction fragment length. *Avian Pathol.*, **35**, 173–179.

8. DAVISON S., GINGERICH, E.N., CASAVANT S. & ECKROADE R.J. (2006). Evaluation of the efficacy of a live fowpox-vectored infectious laryngotracheitis/avian encephalomyelitis vaccine against ILT viral challenge. *Avian Dis.*, **50**, 50–54.
9. GUY J.S. & BAGUST T.J. (2003) Laryngotracheitis. In: Diseases of Poultry, Eleventh Edition, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D., eds. Iowa State University Press, USA, 124-134.
10. HAN M.G. & SIM S.J. (2001). Analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. *Vet. Microbiol.*, **83**, 321–331.
11. HUGHES C.S. & JONES R.C. (1988). Comparison of methods of isolation of infectious laryngotracheitis from field material. *Avian Pathol.*, **17**, 295–303.
12. HUGHES C.S., JONES R.C., GASKELL R.M., JORDAN F.T.W. & BRADBURY J.M. (1987). Demonstration in live chickens of the carrier state in infectious laryngotracheitis virus. *Res. Vet. Sci.*, **42**, 407–410.
13. HUMBERD J., GARCIA M., RIBLET S.M., RESURECCION R.S. & BROWN T.P. (2002). Detection of infectious laryngotracheitis virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **46**, 64–74.
14. JORDAN F.T.W. (1964). Diagnosis of infectious laryngotracheitis by chick embryo inoculation. *J. Comp. Pathol.*, **74**, 119–128.
15. JORDAN F.T.W. & CHUBB R.C. (1962). The agar gel diffusion technique in the diagnosis of infectious laryngotracheitis (ILT) and its differentiation from fowl pox. *Res. Vet. Sci.*, **3**, 245–255.
16. KEAM L., YORK J.J., SHEPPARD M. & FAHEY K.J. (1991). Detection of infectious laryngotracheitis virus in chickens using a non-radioactive DNA probe. *Avian Dis.*, **35**, 257–262.
17. KEY D.W., GOUGH B.C., DERBYSHIRE J.B. & NAGY E. (1994). Development and evaluation of a non-isotypically labeled DNA probe for the diagnosis of infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.*, **38**, 467–474.
18. KIRKPATRICK N.C., MAHMOUDIAN A., COLSON C.A., DEVLIN J.M. & NOORMOHAMMADI A.H. (2006). Relationship between mortality, clinical signs and tracheal pathology in infectious laryngotracheitis. *Avian Pathol.*, **35**, 449–453.
19. McNULTY M.S., ALLAN G.M. & MCCracken R.M. (1985). Infectious laryngotracheitis in Ireland. *Irish Vet. J.*, **39**, 124–125.
20. MEULEMANS G. & HALEN P. (1978). A comparison of three methods of diagnosis of infectious laryngotracheitis. *Avian Pathol.*, **7**, 433–436.
21. OJKIC D., SWINTON J., VALLIERES M., MARTIN E., SHAPIRO J., SANEI B. & BINNINGTON B. (2006). Characterisation of field isolates of infectious laryngotracheitis virus from Ontario. *Avian Pathol.*, **35**, 286–292.
22. OLDONI I. & GARCIA M. (2007). Characterisation of infectious laryngotracheitis virus isolates from the United States by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. *Avian Pathol.*, **36**, 167–176.
23. PIROZOK R.P., HELMBOLDT C.F. & JUNGHER E.L. (1957). A rapid histological technique for the diagnosis of avian infectious laryngotracheitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **130**, 406–407.
24. SCHOLZ E., PORTER R.E. & GUO P.X. (1994). Differential diagnosis of infectious laryngotracheitis from other avian respiratory diseases by a simplified PCR procedure. *J. Virol. Methods*, **50**, 313–321.
25. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (2000). Code of Federal Regulations, Part 9, Section 113.328, Fowl Laryngotracheitis Vaccine. US Government Printing Office. Washington DC, USA.
26. VAN KAMMEN A. & SPADBROW P.B. (1976). Rapid diagnosis of some avian virus diseases. *Avian Dis.*, **20**, 748–751.
27. VEITS J., LUSCHOW D., KINDERMANN K., WERNER O., TEIFKE J. P., METTENLEITER TC. & FUCHS W. (2003). Deletion of the non-essential UL0 gene of infectious laryngotracheitis (ILT) virus leads to attenuation in chickens, and UL0 mutants expressing influenza virus haemagglutinin (H7) protect against ILT and fowl plague. *J. Gen. Virol.*, **84**, 3343–3352.

28. WILKS C.R. & KOGAN V.G. (1979). An immunofluorescence diagnostic test for avian infectious laryngotracheitis. *Aust. Vet. J.*, **55**, 385–388.
29. WILLIAMS R.A., SAVAGE C.E. & JONES R.C. (1994). A comparison of direct electron microscopy, virus isolation and a DNA amplification method for the detection of avian infectious laryngotracheitis virus in field material. *Avian Pathol.*, **23**, 709–720.
30. YORK J.J. & FAHEY K.J. (1988). Diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody ELISA. *Avian Pathol.*, **17**, 173–182.

*
* *

INFLUENZA AVIAIRE

RÉSUMÉ

L'influenza aviaire (IA) est causée par des virus bien identifiés, membres de la famille des Orthomyxoviridae appartenant au genre Influenzavirus A. Il existe trois genres influenza : A, B et C ; seuls les virus influenza A infectent les oiseaux. Le diagnostic se fait par isolement ou détection et caractérisation du virus. En effet, l'infection chez les oiseaux peut induire un tableau clinique très varié différant selon l'hôte, la souche virale, le statut immunitaire de l'hôte, n'importe quelle complication secondaire et les conditions environnementales.

Identification de l'agent pathogène : des suspensions en solution antibiotique d'écouvillonnages oropharyngés et cloacaux (ou de fèces) prélevés sur des oiseaux vivants, ou de fèces et homogénats d'organes provenant d'oiseaux morts, sont inoculés dans la cavité allantoïdienne d'œufs de poule embryonnés de 9 à 11 jours. Les œufs sont incubés entre 35 et 37 °C pendant 4 à 7 jours. L'activité hémagglutinante des liquides allantoïdiens est recherchée dans tout œuf dont l'embryon est mort ou en train de mourir durant l'incubation, ainsi que dans tout œuf à la fin de la période d'incubation. La présence de virus influenza A peut être confirmée par une épreuve d'immunodiffusion entre un virus concentré et un antiserum dirigé contre les antigènes de la nucléocapside et/ou les antigènes de la matrice virale, qui sont communs à tous les virus influenza A. L'isolement sur œufs embryonnés vient d'être récemment remplacé, sous certaines conditions, par la technique de la transcription inverse couplée à une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR).

Pour sous-typer le virus, le laboratoire doit disposer d'antisérums monospécifiques préparés contre les antigènes séparés de chacun des 16 sous-types d'hémagglutinines (H1 à H16) et des 9 sous-types de neuraminidases (N1 à N9) des virus influenza A. Ces antisérums peuvent être utilisés avec le test d'immunodiffusion. Les nouveaux isolats peuvent également être analysés par des tests d'inhibition de l'hémagglutination et de la neuraminidase, employant une batterie d'antisérums polyclonaux dirigés contre de nombreuses souches de tous les sous-types.

Étant donné que les termes *influenza aviaire* hautement pathogène et l'appellation historique « peste aviaire » se réfèrent à une infection par des souches virulentes de virus influenza A, il faut évaluer la virulence d'un isolat pour les volailles domestiques. Tout isolat d'IA hautement pathogène est classé comme virus influenza soumis à déclaration obligatoire (NAI pour Notifiable Avian Influenza). Bien que toutes les souches virulentes isolées jusqu'à présent appartiennent à l'un ou l'autre sous-type H5 ou H7, la plupart des isolats H5 ou H7 ont présenté une faible virulence. En raison du risque de mutation des virus H5 ou H7 faiblement virulents en virus virulents après infection de volailles, tous les virus H5 et H7 ont été également classés comme des virus NAI. Les méthodes utilisées pour déterminer la virulence d'une souche pour les oiseaux ont évolué ces dernières années, suite à une meilleure compréhension du support moléculaire de leur pouvoir pathogène, mais elles impliquent toujours d'abord l'inoculation du virus infectieux à au moins 8 poulets sensibles âgés de 4 à 8 semaines ; les souches considérées comme hautement pathogènes sont celles qui provoquent plus de 75 % de mortalité dans les 10 jours suivant l'inoculation ou dont l'index de pathogénicité par voie intraveineuse (IPIV) est supérieur à 1,2. La caractérisation des souches virulentes suspectes doit être réalisée dans un laboratoire de virologie biosécurisé. Tous les isolats IA virulents sont identifiés comme des virus influenza aviaries à déclaration obligatoire hautement pathogènes (HPNAI pour High Pathogenicity Notifiable Avian Influenza). Quelle que soit leur virulence pour le poulet, les virus H5 ou H7 présentant un site de clivage du fragment de la molécule d'hémagglutinine HA0 de la séquence en acides aminés semblable à ceux déjà observés chez des virus virulents, sont considérés comme des virus HPNAI.

Les isolats H5 et H7 non pathogènes pour les poulets et qui ne présentent pas un motif de clivage du fragment HA0 semblable à une séquence quelconque déjà observée chez des HPNAI, sont identifiés comme des virus influenza aviaries à déclaration obligatoire faiblement pathogènes (LPNAI pour Low Pathogenicity Notifiable Avian Influenza) et les isolats non-H5 ou non H-7 qui ne sont pas hautement pathogènes pour les poulets sont identifiés comme des virus IA faiblement pathogènes.

Épreuves sérologiques : comme tous les virus influenza A possèdent des antigènes similaires au niveau de la nucléocapside et la protéine de matrice, les méthodes d'immunodiffusion en gélose (IDG) sont utilisées pour détecter les anticorps qui leur sont spécifiques. Des préparations virales concentrées contenant l'un et/ou l'autre type d'antigène, sont utilisées dans ces épreuves. Toutes les espèces d'oiseaux ne développent pas des anticorps précipitants détectables. Les épreuves d'inhibition de l'hémagglutination ont été également employées dans le diagnostic sérologique de routine, mais il se peut que cette technique ne détecte pas certaines infections particulières, car l'hémagglutinine est spécifique d'un sous-type. Les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) ont été utilisées pour détecter les anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques des virus influenza de type A.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : historiquement, dans la plupart des pays, les vaccins spécifiquement conçus pour maîtriser ou prévenir les infections par des virus HPNAI ont été interdits ou déconseillés par les agences gouvernementales, car ils pouvaient interférer avec les mesures de police d'abattage sanitaire. Au cours des années 1990, des vaccins à virus inactivés en émulsion huileuse ont été utilisés au Mexique et au Pakistan pour maîtriser des foyers très étendus de NAI, et le Guatemala, le Mexique, et le Salvador et ont vacciné avec un virus recombiné de la variole aviaire exprimant le gène HA homologue. Au cours des épisodes de LPNAI survenus en 1999-2001 en Italie, un vaccin à virus inactivé présentant une hémagglutinine identique au virus sauvage, mais avec une neuraminidase différente a été utilisé. Ceci a permis de différencier les oiseaux vaccinés des oiseaux infectés par le virus sauvage et a abouti à l'éradication du virus sauvage. Des vaccins H5 et H7 ont été utilisés pour prévenir les infections LPNAI dans certaines régions d'Italie et la vaccination contribue au contrôle des infections H5N1 HP dans plusieurs pays d'Asie du Sud-est. Les virus HPNAI ne doivent pas être utilisés comme lot de semence pour la production de vaccin.

Les locaux où sont réalisées des épreuves expérimentales employant des virus HPNAI devront répondre aux exigences OIE s'appliquant au confinement de niveau 4 d'agents pathogènes.

A. INTRODUCTION

L'influenza aviaire soumis à déclaration obligatoire (NAI pour *Notifiable Avian Influenza*) résulte d'une infection par des virus de la famille des *Orthomyxoviridae* classés dans le genre *Influenzavirus A*. Les virus influenza A sont les seuls orthomyxovirus connus pour affecter les oiseaux. Beaucoup d'espèces d'oiseaux se sont montrées réceptives à l'infection par les virus influenza A ; les oiseaux aquatiques constituent un réservoir majeur de ces virus, mais la très grande majorité des virus isolés chez eux se sont révélés faiblement pathogènes pour le poulet et la dinde. Les virus influenza A présentent des communautés antigéniques au niveau de leur nucléocapside et de leur protéine de matrice, mais sont classés en sous-types sur la base des antigènes de l'hémagglutinine (H) et de la neuraminidase (N) (80). Actuellement, 16 sous-types H (H1-H16) et 9 sous-types N (N1-N9) sont reconnus. À ce jour, les virus influenza A hautement pathogènes qui provoquent des symptômes sévères chez les poulets, les dindes et les autres espèces d'importance économique n'ont été associés qu'aux sous-types H5 et H7. Toutefois la plupart des virus de sous-types H5 et H7 isolés d'oiseaux se sont montrés jusqu'à présent faiblement virulents pour les volailles (2). En raison du risque pour un virus H5 ou H7 de faible virulence de devenir pathogène après mutation, tous les virus H5 et H7 ont été identifiés comme des NAI (81).

En fonction de l'espèce d'oiseaux, de l'âge et du type, des caractéristiques particulières de la souche de virus en cause et des facteurs liés à l'environnement, la maladie frappant des oiseaux totalement réceptifs sous sa forme hautement pathogène peut évoluer différemment. Elle peut en effet entraîner soit une mort brutale précédée de peu ou pas de signes cliniques visibles, soit une maladie plus caractéristique avec symptômes variés comprenant des signes respiratoires, des écoulements oculaires et nasaux, de la toux, des claquements de la langue et de la dyspnée, un œdème des sinus et/ou de la tête, de l'apathie, des cris étouffés, une prise d'aliments et de boisson réduites, une cyanose de la peau au niveau des parties non emplumées, de la crête et des barbillons, de la diarrhée et des signes nerveux. Les poules pondeuses présentent d'autres symptômes, notamment une chute de ponte généralement accompagnée de la production d'œufs de piètre qualité. La morbidité élevée observée

s'accompagne classiquement d'une mortalité élevée, qui augmente rapidement et de façon inexplicable. Cependant, aucun de ces signes ne peut être considéré comme pathognomonique. En outre, les virus IA faiblement pathogènes, qui n'entraînent normalement qu'une affection bénigne ou asymptomatique, peuvent dans certains cas induire un tableau clinique de gravité équivalente à celle d'une infection à virus IA hautement pathogène, surtout en cas d'infections secondaires. Le diagnostic de confirmation de la maladie repose par conséquent sur l'isolement du virus causal et la démonstration qu'il remplit un des critères définis au paragraphe B.2. Dans des circonstances bien définies, cette démonstration peut être apportée par la détection du virus chez l'hôte infecté, en recourant notamment à des techniques moléculaires qui permettent de déterminer sa virulence. La détection d'anticorps spécifiques dans le sérum d'oiseaux suspects peut constituer une méthode supplémentaire de diagnostic, mais ne permet pas l'identification précise du virus. Pour les contrôles réglementaires, le diagnostic repose sur les critères de pathogénicité officiellement agréés, basés sur des épreuves *in vivo* ou des déterminations moléculaires (c'est-à-dire la présence d'acides aminés basiques multiples au site de clivage du précurseur HA0 de l'hémagglutinine) et le typage de l'hémagglutinine. Ces définitions évoluent en même temps que progressent nos connaissances scientifiques sur la maladie.

Les virus influenza aviaries à déclaration obligatoire hautement pathogènes (HPNAI pour *High Pathogenicity Notifiable Avian Influenza*) et NAI sont soumis à un contrôle officiel et il existe un risque élevé de dissémination du virus à partir des laboratoires chargés de ce contrôle ; en conséquence, il est recommandé de conduire une analyse de risque pour déterminer le niveau de biosécurité requis pour le diagnostic expérimental et l'inoculation des poulets ; la caractérisation du virus devra être réalisée dans un local de niveau de confinement 3, au minimum. Les locaux devront satisfaire aux exigences du niveau de confinement approprié, déterminé après une analyse de risque et par référence au Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries ». Les pays qui n'ont pas accès à un tel laboratoire spécialisé, qu'il soit national ou régional, sont invités à adresser leurs prélèvements à un Laboratoire de référence de l'OIE.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène (test prescrit pour les échanges internationaux)

Les prélèvements effectués sur des oiseaux morts seront constitués du contenu intestinal (fèces) ou d'écouvillons cloacaux et oropharyngés. Des morceaux de trachée, poumons, sacs aériens, intestin, rate, rein, encéphale, foie et cœur doivent être aussi prélevés et traités soit séparément, soit en mélange.

Les prélèvements effectués sur oiseaux vivants devraient comporter à la fois des écouvillons oropharyngés et cloacaux. Pour éviter de blesser les oiseaux fragiles et de petite taille, les prélèvements seront réalisés avec des petits écouvillons spéciaux à usage humain, que l'on peut généralement trouver dans le commerce. Faute de ce genre d'écouvillons, on peut prélever des fèces fraîches.

Il est conseillé de placer les prélèvements dans une solution isotonique phosphatée tamponnée (PBS) de pH 7,0 à 7,4, contenant des antibiotiques, ou une solution contenant des protéines et des antibiotiques. Ces antibiotiques peuvent varier en fonction des conditions locales, à titre d'exemple de la pénicilline (2 000 unités/ml), streptomycine (2 mg/ml), gentamycine (50 µg/ml) et mycostatine (1 000 unités/ml) peuvent être employés pour les tissus et les écouvillons oropharyngés, mais ces concentrations doivent être multipliées par 5 pour les fèces et les écouvillons cloacaux. Il est important de réajuster le pH de la solution à 7,0-7,4 après addition des antibiotiques. Il est recommandé de rajouter des protéines dans le milieu de transport des écouvillons pour stabiliser le virus (par exemple une infusion cerveau-cœur, du sérum de bovin jusqu'à 5 % [v/v] ou 0,5 % [p/v] d'albumine bovine). Les suspensions à 10–20 % (poids/volume) de fèces et de tissus finement hachés seront placées dans des solutions antibiotiques. Ces suspensions doivent être traitées aussitôt que possible l'issue d'une période d'incubation de 1 à 2 h à température ambiante. Si c'est impossible, les prélèvements peuvent être conservés jusqu'à 4 jours à 4 °C. En cas de stockage prolongé, prélèvements et isolats devraient être conservés à –80 °C. Il faut éviter les congélations et décongélations répétées.

La méthode de choix pour multiplier les virus influenza aviaire A consiste en l'inoculation d'œufs de poule embryonnés exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS), ou indemnes d'anticorps spécifiques (SAN pour *Specific Antibody Negative*). Les surnageants des suspensions de fèces ou de tissus résultant de la clarification après centrifugation à 1 000 g, sont inoculés dans la cavité allantoïdienne d'au moins 5 œufs embryonnés de poule EOPS ou SAN incubés depuis 9 à 11 jours. Les œufs sont incubés entre 35 et 37 °C pendant 4 à 7 jours. Il est conseillé, au fur et à mesure de la mortalité embryonnaire puis pour les embryons survivant jusqu'à la fin de la période d'incubation, de refroidir d'abord tous les œufs correspondants à 4 °C et de tester l'activité hémagglutinante des liquides allantoïdiens (voir paragraphe B.3.b). La détection d'une activité hémagglutinante (HA), dans un liquide amnio-allantoïdiens exempt de bactéries, indique une forte probabilité de présence de virus influenza A ou de *Paramyxovirus* aviaire. Il est recommandé d'inoculer au moins une nouvelle série d'œufs avec les liquides allantoïdiens qui n'ont pas révélé d'activité HA au premier passage.

La présence de virus influenza A peut être confirmée par des épreuves d'immunodiffusion en gélose (IDG) en démontrant la présence des antigènes de nucléocapside et de matrice, lesquels sont communs à tous les *Influenzavirus A* (voir paragraphe B.3.a). Les antigènes peuvent être préparés en concentrant les virus contenus dans les liquides allantoïdiens infectieux ou en extrayant les membranes chorio-allantoïdiennes infectées, qui sont ensuite confrontés à des sérums contenant des anticorps spécifiques. Les virus peuvent être concentrés par ultracentrifugation ou par précipitation en milieu acide à partir de liquides allantoïdiens infectieux. Cette dernière méthode consiste en l'addition de HCl 1,0 M au liquide allantoïdien infecté, jusqu'à ce qu'il atteigne un pH d'environ 4. Le mélange est alors placé dans un bain de glace pendant 1 h, puis clarifié par centrifugation à 1 000 *g* à 4 °C. Le surnageant est rejeté. Les virus concentrés sont repris dans un tampon glycine/sarkosyl consistant en une solution à 1 % (poids/volume) de lauroyl/sarcosinate de sodium tamponnée à pH 9,0 avec de la glycine 0,5 M. Ces concentrés contiennent à la fois les polypeptides de la nucléocapside et de la matrice.

Des préparations riches en nucléocapside peuvent être aussi obtenues à partir des membranes chorio-allantoïdiennes pour être utilisées dans l'épreuve d'IDG (7). Cette méthode implique la collecte des membranes chorio-allantoïdiennes à partir des œufs infectés dont les liquides allantoïdiens présentent une activité hémagglutinante. Les membranes sont ensuite homogénéisées puis broyées jusqu'à atteindre une consistance pâteuse. Cette préparation est soumise à 3 cycles de congélation-décongélation, suivis d'une centrifugation à 1 000 *g* pendant 10 min. Le culot est rejeté et le surnageant est utilisé comme antigène après un traitement au formol à 0,1 %.

L'utilisation de l'épreuve d'IDG pour démontrer la présence des antigènes de la nucléocapside et de la matrice est un moyen satisfaisant pour révéler la présence de virus IA dans les liquides amnio-allantoïdiens, mais des méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) existent également aujourd'hui. Il existe notamment un test ELISA sensible et spécifique qui démontre la présence de la nucléoprotéine du virus influenza de type A au moyen d'un anticorps monoclonal dirigé contre la nucléoprotéine de type A (47, 49, 64). Le kit de diagnostic correspondant se trouve dans le commerce.

Toute activité hémagglutinante de liquides stériles récoltés à partir d'œufs embryonnés est le plus vraisemblablement imputable à un virus influenza A ou à un paramyxovirus aviaire (quelques souches de réovirus aviaires ou des bactéries, si les liquides ne sont pas stériles, peuvent être hémagglutinants). Il existe actuellement 9 sérotypes connus de paramyxovirus aviaires. La plupart des laboratoires disposent de sérums spécifiques pour le virus de la maladie de Newcastle (paramyxovirus aviaire de type 1), et du fait de sa large dispersion et de son utilisation presque universelle comme vaccin à virus vivant chez les volailles, il est préférable de rechercher sa présence éventuelle par une épreuve d'inhibition de l'hémagglutination (IHA), voir le Chapitre 2.3.14., « Maladie de Newcastle ».

La présence de virus influenza peut être aussi confirmée par l'utilisation de la transcription inverse couplée à une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) avec des amorces conservées spécifiques de la nucléoprotéine ou de la protéine de matrice (3, 53), de même que la présence de virus influenza de sous-types H5 ou H7 peut être confirmée par l'utilisation d'amorces H5 ou H7 spécifiques (21, 46, 53, 79).

La méthode recommandée par le comité d'experts de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour le sous-typage antigénique de confirmation (80), implique l'utilisation d'antisérums très spécifiques préparés chez un animal le moins sujet possible à des réactions non spécifiques (par exemple la chèvre) et dirigés contre les sous-types H et N (45). Une technique alternative consiste à utiliser des sérums polyclonaux dirigés contre un éventail de virus influenza non dégradés. Le sous-typage par cette technique étant hors de portée de la plupart des laboratoires de diagnostic non spécialisés en virus influenza, l'assistance des Laboratoires de référence de l'OIE peut être requise dans ce but (se reporter au tableau de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*).

2. Évaluation du pouvoir pathogène

Le terme influenza aviaire hautement pathogène se réfère à sa virulence pour les poulets et suppose l'implication de souches virulentes. Ce terme est utilisé pour décrire une maladie du poulet pleinement réceptif qui s'accompagne de signes cliniques comme un écoulement oculaire et nasal, de la toux, des claquements de la langue et de la dyspnée, un œdème des sinus et/ou de la tête, de l'apathie, des cris étouffés, une prise réduite d'aliments et de boisson, une cyanose de la peau au niveau des parties non emplumées, de la crête et des barbillons, de l'incoordination motrice, des signes nerveux et de la diarrhée. Les poules pondeuses présentent d'autres symptômes, notamment une chute de la ponte généralement accompagnée de la production d'œufs de piètre qualité. La morbidité élevée observée s'accompagne classiquement d'une mortalité élevée, qui augmente rapidement et de façon inexplicable. Cependant, aucun de ces signes ne peut être considéré comme pathognomonique et on peut observer une mortalité élevée sans ces symptômes. En outre, les virus IA faiblement pathogènes, qui n'entraînent normalement qu'une affection bénigne ou asymptomatique, peuvent entraîner une maladie beaucoup plus grave en cas d'infections secondaires ou de conditions environnementales défavorables, et les symptômes rappellent alors ceux d'un IA hautement pathogène. Lors du premier congrès international sur l'IA qui a eu lieu en 1981 (5), il a été convenu d'abandonner le terme « peste aviaire » et de définir les souches d'IA hautement pathogènes sur la base de leur capacité à induire au moins 75 % de mortalité

en 8 jours chez au moins 8 poulets sensibles âgés de 4 à 8 semaines inoculés par voie intramusculaire, intraveineuse ou dans le sac aérien caudal. Cependant, cette définition ne s'est pas avérée satisfaisante, lorsqu'elle a été appliquée aux virus responsables des foyers qui se sont largement répandus chez les poulets en 1983 en Pennsylvanie et dans les États voisins des États-Unis d'Amérique (USA). Le problème résultait principalement de la présence d'un virus considéré comme faiblement pathogène d'après les épreuves de laboratoire, mais qui s'est révélé pleinement virulent après une seule mutation ponctuelle. La prise en considération de telles souches « potentiellement pathogènes » a été ultérieurement incluse dans la réflexion de plusieurs groupes internationaux chargés d'en élaborer une définition.

Les recommandations finales qui ont été faites prenaient en compte le fait que, bien que de nombreux virus faiblement pathogènes de sous-types H5 et H7 aient été isolés, toutes les souches d'IA hautement pathogènes connues à ce jour possédaient une hémagglutinine H5 ou H7. Une information supplémentaire concernant le pouvoir pathogène ou le pouvoir pathogène potentiel des sous-types H5 et H7 peut être obtenue en séquençant le génome, du fait de l'association de la virulence avec la présence d'acides aminés basiques (arginine ou lysine) multiples au site de clivage de l'hémagglutinine. Par exemple, la plupart des virus de sous-type H7 de faible virulence présentent les motifs en acides aminés suivants au niveau du site de clivage HA0 : soit – PEIPKGR*GLF – soit – PENPKGR*GLF – tandis que les motifs en acides aminés pour des virus H7 hautement pathogènes d'IA sont par exemple : -PEIPKKKKR*GLF-, -PETPKRKRKR*GLF-, -PEIPKKREKR*GLF- et -PETPKRRRR*GLF-. Le séquençage des acides aminés des sites de clivage des isolats d'influenza de sous-types H5 et H7 de faible virulence pour les oiseaux, devrait permettre d'identifier des virus, qui, comme les virus de Pennsylvanie, peuvent devenir hautement pathogènes pour les volailles suite à une simple mutation. Pour classer les virus d'IA comme hautement pathogènes, l'OIE a adopté en 1992 des critères reposant sur le pouvoir pathogène pour le poulet, la multiplication en culture cellulaire et la séquence en acides aminés au niveau du peptide de jonction (41). L'Union européenne a adopté des critères similaires en 1992 (16).

Les critères ci-après, qui correspondent à une modification de la procédure OIE précédente, ont été adoptés par l'OIE pour classer un virus d'IA comme HPNAI :

a) Une des deux méthodes suivantes visant à déterminer le pouvoir pathogène pour le poulet est utilisée. Un virus HPNAI est :

- i) tout virus influenza létal¹ pour 6, 7 ou 8 poulets sensibles âgés de 4 à 8 semaines dans les 10 jours suivant l'inoculation par voie intraveineuse de 0,2 ml d'une dilution au 1/10 de liquide allantoïdien infectieux exempt de bactéries.

ou

- ii) tout virus dont l'index de pathogénicité par voie intraveineuse (IPIV) est supérieur à 1,2. La procédure est la suivante :

- un liquide allantoïdien infectieux frais avec un titre HA > 1/16 (> 2⁴ ou > log₂ 4 quand exprimé comme la réciproque de la dilution) est dilué au 1/10 dans une solution saline stérile isotonique ;
- 0,1 ml du virus dilué est injecté par voie intraveineuse à chacun des 10 poulets EOPS ou SAN âgés de 6 semaines ;
- les oiseaux sont observés à 24 h d'intervalle pendant 10 jours. Lors de ces observations, chaque oiseau est noté 0 s'il est normal, 1 s'il est malade, 2 s'il est sévèrement atteint, 3 s'il est mort. (l'appréciation de « malade » ou « sévèrement malade » repose sur une observation clinique subjective). En principe, des oiseaux « malades » présenteront un des signes mentionnés ci-après alors que des oiseaux « sévèrement malades » présentent plus d'un des signes suivants : manifestation respiratoire, dépression, diarrhée, cyanose des zones de peau nue ou des barbillons, œdème de la face et/ou de la tête, symptômes nerveux. Les individus morts doivent être notés 3 à chacun des jours d'observation restants après la mort² ;
- l'index de pathogénicité par voie intraveineuse (IPIV) est la moyenne des scores par oiseau par observation sur la période des 10 jours. Un index de 3,00 signifie que tous les oiseaux sont morts en 24 h et un index de 0,00 signifie qu'aucun oiseau n'a présenté de symptômes pendant la période des 10 jours d'observation.

b) Pour tous les virus H5 et H7 de faible virulence chez le poulet, la séquence en acides aminés du peptide de jonction de l'hémagglutinine doit être déterminée. Si la séquence est semblable à celle observée pour les isolats d'IA hautement pathogène, l'isolat en cours d'analyse sera considéré comme hautement pathogène.

1 Quand les oiseaux sont trop malades pour manger ou boire, il est recommandé de les tuer sans souffrances.

2 Quand les oiseaux sont trop malades pour manger ou boire, il est recommandé de les tuer sans souffrances et de les considérer comme morts à l'observation suivante.

L'OIE a le système de classification suivant pour identifier les virus soumis à déclaration et à mesures de prophylaxie (81) :

- a) tous les isolats IA qui répondent aux critères précités sont identifiés comme virus influenza aviaire à déclaration obligatoire hautement pathogènes (HPNAI).
- b) les isolats H5 et H7 qui ne sont pas virulents pour le poulet et qui ne présentent pas au niveau de leur site de clivage HA0 une séquence en acides aminés semblable à l'une de celles observées chez des virus HPNAI sont identifiés comme virus influenza aviaire faiblement pathogènes soumis à déclaration obligatoire (LPNAI).
- c) les isolats IA non virulents pour le poulet, qui n'appartiennent ni au sous-type H5 ni au sous-type H7, sont identifiés comme des virus influenza aviaire faiblement pathogènes.

Diverses stratégies et techniques ont été utilisées avec succès pour séquencer les nucléotides situés dans la partie du gène HA codant le site de clivage de l'hémagglutinine des sous-types H5 et H7 de l'IA, ce qui permet d'en déduire la nature des acides aminés situés à ce niveau. La méthode la plus communément employée a été la RT-PCR utilisant des amorces d'oligo-nucléotides complémentaires des régions du gène situées de part et d'autre de la zone codant le site de clivage ; cette RT-PCR étant complétée par un séquençage (78). Différentes étapes de la procédure peuvent être facilitées par l'usage de kits de diagnostic commercialisés et de séquenceurs automatiques.

Maintenant que la présence au site de clivage HA0 d'acides aminés basiques multiples est bien admise comme un marqueur précis de la virulence ou d'une virulence potentielle pour les virus influenza H5 et H7, il apparaît inévitable que la détermination du site de clivage par séquençage ou par une autre méthode va devenir la méthode de choix pour une évaluation initiale de la virulence de ces virus et être incorporée dans les définitions officielles. Ceci aura l'avantage de réduire le nombre de tests *in vivo*, bien qu'à présent l'inoculation d'oiseaux soit encore nécessaire pour confirmer un résultat négatif afin de s'assurer qu'une culture ne puisse contenir des mélanges de sous-populations virales de haute et faible virulence.

Bien que tous les virus IA réellement hautement pathogènes isolés jusqu'à présent appartiennent aux sous-types H5 ou H7, on connaît au moins deux isolats, tous deux de sous-types H10 (H10N4 et H10N5) qui auraient correspondu aux définitions de l'OIE et de l'UE de virus d'IA hautement pathogène (76) du fait qu'ils tuaient 7/10 et 8/10 poulets avec des index IPIV > 1,2. Cependant, ils n'induisaient ni mortalité ni signes cliniques après inoculation par voie intranasale et ces virus ne possédaient pas d'acides aminés multiples au site de clivage de leur hémagglutinine. Il apparaît que certains virus IA H10 ont un tropisme pour le rein, puisqu'ils sont retrouvés à haut titre dans cet organe à l'autopsie d'oiseaux infectés, ce qui indique que ces virus possèdent un pouvoir pathogène pour le rein (50). En revanche, on a décrit quatre virus qui avaient des sites de clivage HA0 contenant de multiples acides aminés basiques mais qui faisaient preuve d'une faible virulence (IPIV < 1,2) lorsqu'ils étaient inoculés à des poulets de 6 semaines (33). Les souches Chili 2002 (57) et Canada 2004 (42) de virus d'IA H7N3 hautement pathogène présentent d'autres anomalies puisqu'elles présentent des sites de clivage distincts et anormaux des séquences d'acides aminés, respectivement PEKPKTCSPLSRCRETR*GLF et PENPKQAYRKRMTR*GLF. Ces virus semblent être apparus à l'occasion d'une recombinaison entre le gène HA et, respectivement, le gène de la nucléoprotéine et de la matrice virale, ce qui a entraîné l'insertion au site de clivage HA0 de 11 acides aminés dans le cas du virus chilien et de 7 acides aminés dans le cas du virus canadien. Ces deux virus s'avèrent extrêmement virulents lorsqu'ils sont inoculés par voie veineuse à des poulets de 6 semaines.

3. Épreuves sérologiques

a) Immunodiffusion en gélose (IDG)

Tous les virus influenza A possèdent des antigènes de nucléocapside et de matrice similaires. Cette propriété permet de détecter la présence ou non d'anticorps vis-à-vis de tout virus influenza A, par les épreuves d'IDG. Les préparations virales concentrées que nous avons décrites précédemment contiennent à la fois des antigènes de matrice et de nucléocapside ; les antigènes de matrice diffusent plus vite que les antigènes de nucléocapside. Les épreuves d'IDG ont été largement utilisées en routine pour détecter des anticorps spécifiques témoins d'une infection dans les troupes de poulets et de dindes. Ces épreuves ont généralement fait appel à des préparations enrichies en nucléocapside obtenues à partir de membranes choriollantoïdiennes d'œufs embryonnés de poule (7) infectés à 10 jours d'incubation, ces membranes étant ensuite homogénéisées, soumises à trois cycles de congélation-décongélation, puis centrifugées à 1 000 g. Les surnageants sont inactivés par l'addition de formol à 0,1 % ou 1 % de bêta-propiolactone, centrifugés à nouveau et utilisés comme antigène. Toutes les espèces aviennes ne produisent pas des anticorps précipitants après une infection à virus influenza.

Les épreuves sont généralement réalisées sur gels d'agarose ou d'agar purifié à 1 % (poids/volume) en tampon phosphate salin à 8 % (poids/volume), pH 7,2, versés en boîte de Petri ou sur lame porte-objet, de

manière à former une épaisseur de 2 à 3 mm. À l'aide d'une matrice et d'un emporte-pièce, des puits d'environ 5 mm de diamètre, placés à 2 ou 5 mm de distance, sont découpés dans la gélose. La disposition des puits doit être telle que chaque sérum suspect soit situé à côté d'un sérum connu et de l'antigène. Ceci dans le but de permettre la mise en évidence d'une même ligne de continuité entre le sérum connu, le sérum suspect et l'antigène de nucléocapside. Environ 50 µl de chacun des réactifs devront être déposés dans chaque puits.

Les lignes de précipitation peuvent être détectées après environ 24 à 48 h, mais ceci peut dépendre des concentrations en anticorps et en antigène. Ces lignes sont plus visibles par transillumination oblique sur fond noir. Le résultat est considéré comme positif et spécifique lorsque la ligne de précipitation visible entre le puits du sérum témoin positif et l'antigène prolonge la ligne formée entre le puits du sérum à tester et l'antigène. La présence de lignes croisées signe une absence d'identité entre le sérum à tester et les anticorps présents dans le puits du sérum témoin positif.

b) Épreuves d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination

Des variantes dans les procédures des épreuves d'hémagglutination (HA) et d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) sont mises en œuvre dans les différents laboratoires. Les exemples recommandés ci-après s'appliquent à l'utilisation de microplaques avec fonds en V dans lesquelles le volume final pour l'une ou l'autre épreuve est de 0,075 ml. Les réactifs requis pour ces épreuves sont du PBS isotonique (0,1 M), pH 7,0-7,2, et des globules rouges (GRs) prélevés sur trois poulets EOPS ou SAN au moins et mélangés volume pour volume à une solution d'Alsever. Le culot d'hématies doit être lavé trois fois en PBS, avant que ces hématies ne soient utilisées en suspension à 1 % volume pour volume. Des antigènes et antisérums témoins positifs et négatifs appropriés doivent être utilisés avec chacune de ces épreuves.

• Épreuve d'hémagglutination

- i) Distribuer 0,025 ml de PBS dans chacun des puits de la microplaque en plastique à fond en V.
- ii) Déposer 0,025 ml de la suspension virale (c'est-à-dire du liquide allantoïdien infectieux) dans le premier puits. En vue d'une détermination précise du titre HA, il est recommandé de le faire à partir de séries de dilutions assez proches par exemple 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, etc.
- iii) Faire des dilutions de deux en deux de la suspension virale sous 0,025 ml, d'un bout à l'autre de la plaque.
- iv) Distribuer à nouveau 0,025 ml de PBS dans chaque puits.
- v) Distribuer 0,025 ml d'hématies de poulet à 1 % dans chacun des puits.
- vi) Mélanger en tapotant doucement la microplaque, puis laisser les hématies sédimenter pendant environ 40 min à température ambiante, c'est-à-dire environ 20 °C, ou pendant 60 min à 4 °C en cas de températures ambiantes élevées, temps au bout duquel les hématies témoins doivent avoir sédimenter en formant une pastille nette.
- vii) Le titre HA est déterminé en inclinant la plaque et en observant la présence ou l'absence d'une coulée en forme de larme des hématies. Le titre doit être lu comme la dilution maximale à laquelle est observée une hémagglutination complète (absence d'écoulement) ; celle-ci représente une unité HA.

• Épreuve d'inhibition de l'hémagglutination

- i) Distribuer 0,025 ml de PBS dans chaque puits de la microplaque à fond en V.
- ii) Déposer 0,025 ml de sérum dans le premier puits de la plaque.
- iii) Exécuter des dilutions de 1/2 en 1/2 du sérum, sous un volume de 0,025 ml, d'un bout à l'autre de la plaque.
- iv) Ajouter 4 UHA de virus ou antigène sous 0,025 ml dans chaque puits et laisser pendant au moins 30 min à température ambiante (c'est-à-dire à environ 20 °C) ou 60 min à 4 °C.
- v) Ajouter 0,025 ml d'hématies de poulet à 1 % (volume/volume) dans chaque puits, mélanger doucement puis laisser les hématies sédimenter pendant environ 40 min à température ambiante, c'est-à-dire à environ 20 °C, ou pendant 60 min à 4 °C si les températures ambiantes sont élevées, temps après lequel les hématies témoins devront avoir sédimenter en formant une pastille nette.
- vi) Le titre IHA est la dilution maximale de sérum à laquelle est observée une inhibition complète de 4 UHA d'antigène. L'agglutination est évaluée en inclinant la microplaque. Seuls les puits dans lesquels l'écoulement des hématies se fait à la même vitesse que celui des puits témoins (contenant seulement 0,025 ml d'hématies et 0,025 ml de PBS) devront être considérés comme présentant une inhibition.

- vii) La validité des résultats devra être appréciée en confrontant un sérum témoin négatif, qui ne devra pas avoir un titre supérieur à $\frac{1}{4}$ ($> 2^2$ ou $> 2 \log_2$ si exprimé comme la réciproque de la dilution) et un sérum positif témoin qui devra présenter à une dilution près, un titre égal à son titre annoncé.

Les titres IHA peuvent être considérés comme positifs s'il y a une inhibition à une dilution d'au moins $1/16$ (2^4 ou $4 \log_2$ si exprimé comme la réciproque de la dilution) vis-à-vis de 4 UHA d'antigène. Quelques laboratoires préfèrent utiliser 8 UHA dans les épreuves IHA. Bien que ce soit permis, cela modifie l'interprétation des résultats de telle sorte qu'un titre est considéré positif s'il est d'au moins $1/8$ (2^3 ou $3 \log_2$). La signification d'un titre positif minimum ne doit pas être mal interprétée ; l'existence d'un tel titre chez les oiseaux vaccinés ne veut pas dire, par exemple, qu'ils seront protégés d'une épreuve virulente, ni que ceux qui présentent des titres inférieurs ne résisteront pas à cette épreuve.

Les sérums de poulet produisent rarement des réactions positives non spécifiques dans cette épreuve, et aucun traitement préliminaire des sérums n'est nécessaire. Les sérums d'espèces autres que le poulet peuvent quelquefois agglutiner les hématies de poulet, aussi cette propriété devra-t-elle être déterminée préalablement et neutralisée par adsorption du sérum avec des hématies de poulet. Ceci est réalisé en ajoutant 0,025 ml de culot d'hématies de poulet à 0,5 ml d'antisérum, en remuant doucement puis en laissant en contact pendant au moins 30 min ; les hématies sont alors culottées par centrifugation à 800 *g* pendant 2 à 5 min et les sérums adsorbés sont décantés. On peut aussi utiliser des hématies de l'espèce dont proviennent les sérums.

L'épreuve d'inhibition de la neuraminidase est utilisée pour identifier le type de neuraminidase de l'isolat et pour caractériser les anticorps chez les oiseaux infectés. La procédure requiert une expertise et des réactifs spéciaux ; par conséquent cette analyse est en général réalisée dans un Laboratoire de référence de l'OIE. La stratégie DIVA (consistant à différencier les animaux infectés des animaux vaccinés), utilisée en Italie, repose également sur l'utilisation d'une épreuve sérologique de détection spécifique des anticorps anti-N ; la méthode a été décrite (12).

Des kits de diagnostic commerciaux ELISA détectant des anticorps dirigés contre la nucléocapside sont disponibles. Des kits ELISA indirect ou de compétition ont été développés et sont maintenant utilisés pour détecter les anticorps spécifiques du virus IA. Ces kits doivent être validés pour chacune des espèces dont sont testés les sérums. Il existe différentes épreuves avec différentes préparations antigéniques. Ces épreuves ont en général été évaluées et validées par le fabricant, il est par conséquent important de suivre soigneusement les instructions pour leur utilisation.

4. Capture de l'antigène et techniques moléculaires

Pour le moment, les techniques conventionnelles d'isolement et de caractérisation du virus demeurent les méthodes de choix pour le diagnostic de l'IA, du moins pour le diagnostic initial des infections par l'IA. Cependant, les méthodes conventionnelles sont coûteuses, lourdes et lentes. De très importants développements et améliorations ont vu le jour dans les techniques de diagnostic qu'il soit ou non moléculaire et beaucoup d'entre elles ont été appliquées au diagnostic des infections par l'IA.

a) Détection de l'antigène

Il existe dans le commerce plusieurs kits de capture de l'antigène qui peuvent détecter la présence des virus influenza A chez les volailles (49). La plupart des kits utilisent des tests immuno-enzymatiques et utilisent un anticorps monoclonal dirigé contre la nucléoprotéine et devrait donc permettre de détecter tout virus influenza A. Le principal avantage de ces tests est qu'ils permettent de mettre en évidence la présence du virus en 15 min. Leurs désavantages sont qu'ils peuvent manquer de sensibilité, qu'ils ne sont pas toujours validés pour être utilisés sur différentes espèces d'oiseaux, qu'ils ne permettent pas d'identifier les sous-type de virus et qu'ils sont coûteux. Ces tests n'ont de valeur indicative qu'au niveau du troupeau et non au niveau individuel. Ce sont les prélèvements oropharyngés ou trachéaux provenant d'oiseaux malades ou morts qui permettent le mieux de détecter l'antigène. Néanmoins, le manque de sensibilité de ces tests de détection de l'antigène reste leur principal défaut. Chua *et al.* (14) ont comparé cinq tests de ce type et montré que leur sensibilité allait de 36,3 % à 51,4 % ; s'agissant de prélèvements cloacaux ou trachéaux, ces auteurs ont fait remarquer que les épreuves faites sur des oiseaux aquatiques ou sauvages donnaient de moins bons résultats, en termes de sensibilité, que celles faites sur des poulets.

b) Détection directe de l'ARN

Bien que, comme en atteste les définitions actuelles de l'HPNAI, les techniques moléculaires aient été utilisées depuis quelque temps pour le diagnostic de l'IA, il y a eu récemment des développements dans leur application pour la détection et la caractérisation des virus d'IA directement à partir de prélèvements d'oiseaux infectés vivants. Il est impératif, lorsqu'on utilise des méthodes très sensibles de détection moléculaire de l'ARN viral en vue d'un diagnostic de confirmation d'IA, de respecter un protocole rigoureux

de travail, pour éviter toute contamination croisée entre prélèvements de terrain. En outre, les méthodes de RT-PCR doivent être aux normes de l'OIE (voir le Chapitre 1.1.4., « Principes de la validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses ») et être étudiées sur de vrais prélèvements, afin de prouver que les tests de diagnostic sont bien « adaptés à leur but » et utilisables sur le terrain, en recourant le cas échéant à des épreuves normalisées du laboratoire lui-même. C'est ainsi que l'amplification par PCR d'un « gène de ménage » facilite la normalisation des résultats en donnant des informations sur ce gène cible, qui équivaut quantitativement à la présence du prélèvement sur l'écouvillon. Les réactifs témoins permettent d'améliorer le degré de confiance que l'on peut placer dans l'intégrité des réactions moléculaires, dans les prélèvements de terrain et dans les résultats.

Les techniques RT-PCR appliquées aux échantillons cliniques, peuvent, à condition de disposer d'amorces adaptées, aboutir à une détection et une identification rapides du sous-type (au moins H5 et H7), avec en plus l'obtention d'un ADNc pouvant être utilisé pour le séquençage nucléotidique (37, 54, 55). Les résultats obtenus par Koch (24) indiquent que des précautions doivent être prises dans le choix des échantillons utilisés étant donné que les échantillons trachéaux provenant d'oiseaux infectés montrent une sensibilité et spécificité élevée par référence à l'isolement viral, alors que les échantillons fécaux manquent de sensibilité. La réelle application des RT-PCR directes peut résider dans l'identification rapide des foyers secondaires, une fois que les premiers élevages infectés ont été détectés et que le virus a été caractérisé. Cette méthode a été utilisée avec succès durant les foyers d'IA hautement pathogène de 2003 aux Pays-Bas. Des tests inter-laboratoires récemment conduits dans l'Union Européenne ont identifié des protocoles de RT-PCR sur virus H5 et H7 suffisamment sensibles pour permettre une amplification directe à partir des écouvillonnages réalisés sur des volailles infectées par l'IA hautement pathogène (51).

Des modifications dans l'usage de la RT-PCR ont été appliquées de manière à réduire le délai à la fois pour l'identification du sous-type viral et le séquençage. Par exemple Spackman *et al.* (53) ont utilisé une RT-PCR en temps réel en une étape reposant sur le principe d'amorces et d'une sonde libérant un fluorochrome une fois hydrolysée ; cette technique permet la détection de virus d'IA et la détermination des sous-types H5 ou H7. Les auteurs ont conclu que le test présentait de bonnes performances par référence à l'isolement viral et offrait une alternative de diagnostic plus économique et beaucoup plus rapide en moins de 3 h à partir de prélèvements de terrain. L'épreuve est très sensible et elle a une spécificité équivalente à celle de l'isolement du virus d'écouvillonnages trachéaux ou oropharyngés de poulets et de dindes, mais elle peut manquer de sensibilité pour détecter les virus IA dans des écouvillonnages de cloaque, dans les fèces et dans les organes de certaines espèces d'oiseaux du fait de la présence d'inhibiteurs de la PCR qui sont à l'origine de faux résultats négatifs (18). En incluant un témoin interne dans l'épreuve, on s'assurera que tout se passe bien.

La PCR en temps réel, généralement basée sur une sonde d'hydrolyse de type « TaqMan » qui déclenche un signal fluorescent spécifique de cible, est devenue la méthode de choix dans nombre de laboratoires pour un diagnostic d'orientation à partir des prélèvements cliniques. La méthode donne des résultats rapides, avec une sensibilité et une spécificité comparables à celle de l'isolement du virus, donc avec les qualités idéales en cas de foyer d'IA où la rapidité à laquelle un diagnostic de certitude peut être posé est essentielle pour les autorités vétérinaires responsables des décisions à prendre. En outre, les épreuves RT-PCR sont conçues pour être réalisables dans des plaques à 96 trous et combinées à une extraction automatisée très performante à partir des prélèvements (1).

L'approche diagnostique utilisant la PCR en temps réel adoptée dans la plupart des laboratoires s'est basée sur une détection initiale du genre IA dans des prélèvements cliniques, ciblée essentiellement au départ sur le gène (M) de la matrice, qui est hautement conservé dans tous les influenza virus de type A puis sur une RT-PCR en temps réel qui recherche les virus de sous-types H5 et H7. Pour cette identification de sous-type, les amorces utilisées dans la RT-PCR en temps réel TaqMan sont ciblées sur la région HA2, par ce que cette région est relativement bien conservée dans les gènes de l'hémagglutinine des sous-types H5 et H7 et qu'elle a servi de région cible pour H5 et H7. Spackman *et al.* (53), ont démontré la spécificité de cette détection tout en prévenant bien que leurs séquences d'amorce/sonde avaient été conçues pour la détection d'isolats H5 et H7 d'Amérique du Nord et pourraient donc ne pas convenir pour tous les isolats H5 et H7. Ceci s'est confirmé. Slomka *et al.* (52) ont décrit une modification des séquences d'oligonucléotides H5 qu'avaient utilisées Spackman *et al.* (53), qui permet de détecter la lignée asiatique des virus d'IA hautement pathogène H5N1 et d'autres virus IA H5 d'Eurasie isolés au cours des décennies précédentes tant chez les volailles domestiques que chez les oiseaux sauvages. Cette RT-PCR en temps réel, validée pour les virus H5 eurasiens, s'est avérée très utile pour analyser les nombreux prélèvements de virus d'IA hautement pathogène H5N1 adressés aux Laboratoires internationaux de référence d'Europe, d'Afrique et d'Asie depuis l'automne 2005 (52).

L'un des problèmes vite soulevé avec l'émergence de ces nouveaux tests est que des méthodes et protocoles peuvent être développés et publiés sans que l'épreuve soit correctement validée. Ce problème a été résolu dans le cas de certains protocoles de RT-PCR en temps réel (52, 56). Dans l'Union Européenne,

les Laboratoires nationaux de référence ont collaboré pour définir et valider les protocoles dont l'usage peut être recommandé au sein de l'Union Européenne (51, 52).

Des protocoles RT-PCR en temps réel ont été décrits qui amplifient des régions appartenant au site de clivage du gène HA0. Ils peuvent constituer d'utiles épreuves pour des virus spécifiques. C'est ainsi que Hoffman *et al.* (27) ont décrit une épreuve RT-PCR en temps réel pour les virus d'IA hautement pathogène H5N1 d'Asie, clade Quinqhai 2.2, qui constitue un moyen rapide de détermination sans séquençage du pathotype pour ce sous-groupe de virus d'IA hautement pathogène H5N1.

Des modifications de la simple technique RT-PCR de détection de l'ARN viral ont été conçues pour réduire : les effets des substances inhibitrices présentes dans les prélèvements, la possibilité de contamination par des acides nucléiques et le délai d'obtention des résultats. Par exemple, l'amplification basée sur une séquence d'acide nucléique (NASBA, *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) suivie d'une détection par électrochimiluminescence (NASBA/ECL) est une réaction qui se déroule à température constante ne nécessitant pas de thermocycleur. Les tests NASBA ont été développés pour la détection en 6 h des virus IA de sous-types H7 et H5 dans les prélèvements cliniques (15, 29). La méthode LAMP (*Loop mediated Isothermal Amplification*) est apparue hautement sensible et de spécificité fiable (28).

Il paraît très vraisemblable que la technologie moléculaire se sera d'ici peu suffisamment développée pour réaliser, dans l'élevage même, des tests permettant de détecter la présence de virus IA et de déterminer précisément leurs sous-type et leurs marqueurs de virulence. L'importance de l'utilisation de ces tests dans le diagnostic de l'IA dépendra beaucoup d'une adoption consensuelle des définitions qui concernent les infections à statut réglementé en matière de prophylaxies et d'échanges.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Lorsqu'on vise à éradiquer l'infection, il est important de ne pas considérer la vaccination comme la seule solution permettant d'éliminer les sous-types de virus influenza soumis à déclaration obligatoire (NAI) ou de virus IA faiblement pathogènes. Sans l'application de systèmes de suivi, de mesures de biosécurité rigoureuses et d'abattage en cas d'infection, ces virus pourraient être à l'origine d'une enzootie chez les volailles vaccinées. La circulation à long terme du virus dans une population vaccinée peut entraîner des modifications à la fois antigéniques et génétiques du virus, comme cela s'est passé au Mexique (31).

Expérimentalement, qu'il s'agisse de virus de l'influenza aviaire NAI ou faiblement pathogène, il est démontré que la vaccination protège contre les signes cliniques et la mortalité, réduit l'excrétion virale et augmente la résistance à l'infection ; elle protège contre différents virus sauvages ayant le même sous-type d'hémagglutinine, elle protège vis-à-vis d'une exposition faible à forte et réduit de ce fait la transmission du virus d'épreuve par contact (13, 19, 59, 65). Cependant, le virus est encore capable d'infecter des oiseaux vaccinés et de s'y répliquer de manière inapparente. La plupart des recherches sur les vaccins ont été réalisées sur des poules et des dindes et ce n'est donc qu'avec prudence qu'on peut extrapoler leurs résultats à d'autres espèces. C'est ainsi que, avec un protocole expérimental utilisant un virus d'épreuve d'IA hautement pathogène H7N7 chez des poules et des canards à collier noir (*Callonetta leucophrys*), il a été démontré que la vaccination augmentait la résistance à l'infection et réduisait l'excrétion virale ainsi que la transmission du virus entre oiseaux ; par contre, avec un protocole utilisant des faisans dorés *Chrysolophus pictus*, aucune réduction n'était constatée dans l'excrétion du virus d'épreuve ni dans sa transmission, même si les oiseaux ne présentaient pas de signes cliniques de maladie (69, 70). Dans certains pays, les vaccins visant à contenir ou prévenir le NAI sont spécifiquement interdits ou leur emploi est découragé par les agences gouvernementales, parce qu'elles considèrent que les vaccins peuvent interférer avec les mesures de police sanitaire et d'abattage. Cependant, la plupart des textes réglementaires concernant le contrôle de l'IA prévoient le droit de recourir aux vaccins en situation d'urgence.

Les vaccins conventionnels à virus influenza vivants, quel que soit le sous-type visé, ne sont pas recommandés.

• Vaccins conventionnels

Traditionnellement, les vaccins utilisés jusqu'à présent contre l'influenza aviaire NAI ou faiblement pathogène ont été préparés à partir de liquides allantoïdiens inactivés par la bêta-propiolactone ou le formol et émulsifiés avec une huile minérale.

L'existence d'un grand nombre de sous-types viraux, jointe à la variation connue des différentes souches au sein d'un même sous-type, pose des difficultés sérieuses pour la sélection des souches destinées à la production de vaccins influenza, en particulier contre les virus de l'IA faiblement pathogène. De plus, certains isolats ne se répliquent pas à un titre assez élevé pour permettre la production de vaccins assez puissants sans qu'une étape

préalable et coûteuse de concentration ne soit nécessaire. À côté d'une stratégie vaccinale basée sur la production d'auto-vaccins (c'est-à-dire préparés à partir d'isolats spécifiquement impliqués dans une épizootie), une autre consiste à utiliser des vaccins préparés à partir de virus ayant le même sous-type d'hémagglutinine et offrant de bons rendements au plan de la concentration en antigène. Aux États-Unis d'Amérique par exemple, de tels vaccins ont été normalisés dans une certaine mesure par le Centre des produits biologiques vétérinaires (*Center for Veterinary Biologics*) qui a multiplié et conservé des virus influenza de sous-types différents, en vue de leur emploi comme souche de semence dans la préparation des vaccins à virus inactivés (6).

Aux États-Unis d'Amérique depuis les années 1970, certains vaccins à virus inactivés ont été produits et vendus avec une autorisation particulière de mise sur le marché (25, 35, 43). Ces vaccins ont été utilisés en priorité chez la dinde, pour les protéger contre des virus non hautement pathogènes mais tout de même capables de causer de sérieux problèmes, notamment en présence de conditions aggravantes. Des quantités de vaccin non négligeables ont été utilisées (26, 35). Aux États-Unis d'Amérique, la majorité des autorisations de mise sur le marché dernièrement accordées concernaient des vaccins destinés à protéger les dindes contre les virus de la grippe porcine à virus H1 et H3 (58). Un vaccin classique contre la souche dominante de virus de l'IA faiblement pathogène a aussi été utilisé en Italie pendant plusieurs années (17). La vaccination contre les infections à H9N2 a été utilisée en Iran (72), au Pakistan (39) et en République Populaire de Chine (32) et dans plusieurs pays du Moyen-Orient.

Des vaccins à virus inactivé ont été préparés à partir du virus LPNAI de sous-type H7N3 responsable d'une série de foyers survenus dans des élevages de dindes de l'Utah en 1995 ; ils ont été utilisés, en accompagnement d'autres mesures, pour contrôler la situation (26). De la même manière, dans le Connecticut en 2003, la vaccination de poules pondeuses guéries de l'infection et des poulettes de remplacement, avec un vaccin H7N2 ou H7N3 a été mise en place après un foyer à virus LPNAI causé par un virus H7N2 (61).

Le Mexique, suite aux foyers survenus en 1994-1995 (21, 22, 23), et le Pakistan, suite aux foyers de 1995 (38), ont recouru à la vaccination contre l'influenza HPNAI de sous-types H5N2 et H7N3 respectivement. Au Mexique le virus HPNAI semble avoir été éradiqué, mais le virus LPNAI H5N2 a continué à circuler, tandis qu'au Pakistan des virus d'IA hautement pathogènes proches génétiquement du virus d'origine hautement pathogène, étaient encore isolés en 2001 (66) et 2004. À Hong Kong en 2002 (48), à la suite des foyers liés à des virus H5N1 hautement pathogènes, des mesures de vaccination avec un vaccin H5N2 ont été adoptées. En 2004, la grande extension des foyers d'IA H5N1 hautement pathogènes dans quelques pays du Sud-est asiatique a conduit l'Indonésie, la République Populaire de Chine et le Viêt-Nam à mettre en place dans l'urgence une vaccination préventive. Des vaccins à virus IA H7N7 inactivés ont été utilisés en Corée du Nord en 2005, pour maîtriser un foyer de virus d'IA hautement pathogène. Ce type de vaccination a été aussi utilisé en Italie, dans des zones géographiques limitées, pour aider à maîtriser les virus LPNAI H5 et H7. Récemment, des vaccinations du même genre ont été autorisées dans plusieurs pays de l'Union Européenne pour des volailles élevées en liberté et des oiseaux de zoo.

• Vaccins à virus recombinés

Des vaccins à virus recombinés de l'IA ont été obtenus en insérant le gène codant l'hémagglutinine du virus influenza, dans un vecteur viral vivant ; ils ont été utilisés pour immuniser des volailles contre l'IA (60). Les vaccins vectorisés à virus recombinés vivants présentent plusieurs avantages : [1] ce sont des vaccins capables d'induire à la fois une immunité humorale et cellulaire, [2] ils peuvent être administrés à de jeunes oiseaux et induire une protection précoce, par exemple le vaccin poxvirus aviaire, qui peut être administré dès l'âge de 1 jour, est compatible avec le vaccin de la maladie de Marek et induit une protection significative une semaine plus tard, [3] ils permettent de différencier les oiseaux infectés des oiseaux vaccinés, étant donné, par exemple qu'ils n'induisent pas de production d'anticorps contre les antigènes de la nucléoprotéine ou de la protéine de matrice communs à tous les virus IA. Par conséquent, seuls les oiseaux infectés naturellement présenteront des anticorps lors des épreuves d'IDG ou ELISA qui détectent les anticorps influenza A (nucléoprotéine et/ou protéine de matrice). Cependant ces vaccins à virus recombinés ont des limites du fait qu'ils se répliquent peu et n'induisent qu'une protection partielle chez des oiseaux ayant été déjà exposés au virus utilisé comme vecteur (soit par une infection naturelle soit par une exposition préalable à ce même vecteur lors d'une vaccination antérieure). Les virus de la variole aviaire ou de la laryngotrachéite infectieuse sont les virus actuellement utilisés comme vecteurs dans les vaccins à virus recombinés (34, 62). Si ces vaccins sont utilisés chez des oiseaux d'1 jour ou de jeunes poussins, l'interférence des anticorps maternels vis-à-vis du vecteur sur l'efficacité du vaccin, différera selon le type de vecteur. En ce qui concerne le vaccin à poxvirus aviaire recombiné, il a été rapporté qu'une immunisation effective était obtenue en vaccinant des poussins ayant différents niveaux d'immunité maternelle (4). Cependant il serait souhaitable de confirmer l'efficacité du vaccin à virus recombiné de la variole aviaire chez des poussins d'un jour présentant des niveaux d'anticorps maternels très élevés, qu'ils résultent d'une infection antérieure ou d'une vaccination. De plus, du fait que les vecteurs sont des virus non inactivés, il peut exister une barrière d'espèce (par exemple le virus de la laryngotrachéite infectieuse ne se réplique pas chez la dinde), aussi l'utilisation de ces vaccins doit-elle être restreinte aux espèces pour lesquelles une efficacité a été démontrée.

L'utilisation de vaccins à virus recombinés est limitée aux pays dans lesquels ces vaccins sont officiellement autorisés sur le marché. Le vaccin à poxvirus recombiné aviaire contre l'IA H5 est autorisé aux États-Unis d'Amérique, au Guatemala, au Mexique, en République Populaire de Chine et au Salvador (59, 82). Ces vaccins poxvirus aviaires recombinés contenant l'hémagglutinine H5 ont été produits et évalués sur le terrain (8, 23, 44, 63), mais la seule expérience de terrain avec ce vaccin a eu lieu au Guatemala, au Mexique, en République Populaire de Chine et au Salvador à l'occasion de son utilisation dans des campagnes de vaccination contre les virus de l'IA faiblement pathogène H5N2 et hautement pathogène H5N1. Entre 1995 et 2006, le Mexique a utilisé plus de 1,788 milliard de doses de vaccin à virus inactivé H5N2 dans ses programmes de lutte contre ce virus (73, 74). En outre, de 1997 à 2005, le Guatemala, le Mexique et le Salvador ont utilisé plus de 1,6 milliard de doses de vaccin à virus pox aviaire recombiné IA-H5 pour contrôler l'influenza LPNAI H5N2, et la République Populaire de Chine en a utilisé 606 millions de doses en 2005 (82).

Le virus de la maladie de Newcastle peut également être utilisé comme vecteur d'expression des gènes HA des virus influenza (40). Un vaccin à virus de la maladie de Newcastle recombiné (clone 30) contenant et exprimant le gène HA H5 a protégé des poulets contre une épreuve virulente réalisée soit avec le virus de la maladie de Newcastle soit avec le virus d'IA hautement pathogène H5N2 (71). Un virus recombiné similaire utilisant la souche La Sota et exprimant le gène HAH5 de la lignée Asie a été produit en République Populaire de Chine (24) et est considéré comme protecteur contre les deux virus. Ce vaccin a été autorisé sur le marché chinois et largement utilisé comme l'un des quatre vaccins H5 autorisés dans les campagnes de vaccination obligatoires actuellement en cours et qui ont concerné 8,2 milliards de poulets entre janvier et septembre 2006 (36). Comme dans le cas des autres vaccins à virus recombinés, il paraît peu probable que ce vaccin soit utilisable chez les oiseaux plus âgés, qui ont déjà été bien immunisés contre la maladie de Newcastle, et son efficacité pourrait être gênée par les anticorps maternels contre le virus vecteur ou l'hémagglutinine IA éventuellement présents chez certains jeunes sujets. Le système d'expression en baculovirus a été utilisé pour produire des antigènes recombinés H5 et H7 destinés à être incorporés dans des vaccins (75). L'ADN codant l'hémagglutinine H5 a été évalué comme vaccin potentiel chez les volailles (30).

• Détection de l'infection dans les bandes vaccinées et chez les oiseaux vaccinés

Une stratégie permettant de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés (DIVA, pour *Discriminating infected from vaccinated animals*), est apparue comme une solution possible à l'éradication éventuelle du NAI sans recourir à un abattage et en évitant les conséquences économiques dommageables qui en résulteraient, en particulier dans les pays en développement (20). Cette stratégie bénéficie des avantages de la vaccination (du fait de la présence moindre de virus dans l'environnement), tout en laissant la possibilité d'identifier les lots infectés ce qui permet d'appliquer d'autres méthodes de contrôle, dont l'abattage. La méthode DIVA fait appel à deux grandes stratégies au sein d'une population vaccinée : 1) elle détecte le virus de l'influenza aviaire, ou 2) elle détecte les anticorps dirigés contre ce virus. Au niveau d'une bande de volailles une méthode simple consiste à suivre régulièrement des oiseaux sentinelles non vaccinés laissés dans chaque bande vaccinée, mais cette approche soulève des problèmes de mise en œuvre notamment en ce qui concerne l'identification des oiseaux sentinelles dans des grandes bandes. Une méthode alternative ou complémentaire pour détecter l'infection naturelle peut consister à rechercher le virus sauvage ou les anticorps dirigés contre ce virus chez les animaux vaccinés. Le virus peut être recherché sur des écouvillonnages cloacaux ou oropharyngés obtenus sur les oiseaux trouvés morts chaque jour ou sur des malades. Cette recherche se fera par des méthodes moléculaires, telles que la RT-PCR en temps réel ou un ELISA de capture de l'antigène, sur des prélèvements individuels ou groupés effectués sur des oiseaux vaccinés.

Pour pouvoir appliquer la méthode DIVA, il faut utiliser des stratégies vaccinales permettant de détecter une exposition à l'infection naturelle dans des populations vaccinées. Plusieurs de ces stratégies ont été utilisées ces dernières années. Elles incluent l'utilisation d'un vaccin contenant un virus du même sous-type d'hémagglutinine (H) mais de sous-type de neuraminidase (N) différent de celui correspondant au virus du terrain. Les anticorps spécifiques de la neuraminidase du virus sauvage tiennent lieu de marqueurs de l'infection. Ce système a été utilisé en Italie en 2000 à la suite de la réémergence du virus H7N1 LPNAI. De manière à renforcer les mesures de contrôle, une stratégie DIVA a alors été mise en œuvre, utilisant un vaccin H7N3 pour lutter contre une infection naturelle H7N1. Les oiseaux vaccinés ont été distingués des oiseaux naturellement infectés au moyen d'une épreuve sérologique consistant à détecter les anticorps spécifiques anti-N (10, 11). La même stratégie a été utilisée pour contrôler l'influenza LPNAI dû à un virus H7N3 en 2002-2003, en Italie (9), en recourant cette fois-ci à un vaccin H7N1. Dans les deux cas, la vaccination jointe à l'abattage sanitaire et à la stratégie DIVA a abouti à l'éradication du virus sauvage. Le problème avec ce système pourrait tenir au fait qu'il ne permet pas de repérer l'émergence d'un virus sauvage possédant une neuraminidase N différente de celle du virus circulant, ni la co-circulation de plusieurs sous-types (avec différentes neuraminidases).

Une alternative réside dans l'utilisation de vaccins contenant seulement HA, c'est-à-dire de vaccins à virus recombinés ; cette stratégie permet d'employer les tests classiques IDG et ELISA basés sur la nucléoprotéine et la protéine de matrice, afin de détecter l'infection chez des oiseaux vaccinés. En ce qui concerne les vaccins à virus inactivés, un test basé sur la détection des anticorps spécifiques de la protéine non structurale a été décrit (67). Ce système reste à être validé sur le terrain.

• Production de vaccins conventionnels

L'information donnée ci-dessous est d'abord basée sur les expériences acquises aux États-Unis d'Amérique ainsi que sur les recommandations et réglementations s'appliquant à l'autorisation de mise sur le marché des vaccins IA dans ce pays (68). Les principes de base pour la production des vaccins, en particulier des vaccins à virus inactivés, sont communs à plusieurs virus par exemple celui de la maladie de Newcastle (Chapitre 2.3.14.).

Les recommandations pour la production des vaccins à usage vétérinaire sont décrites au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les recommandations détaillées ci-après ainsi que dans le Chapitre 1.1.8. ont un caractère général par essence et peuvent être complétées par des exigences à portée nationale et régionale.

Les unités de production de vaccin doivent fonctionner selon des procédures et pratiques de biosécurité appropriées. Si du virus HPNAI est utilisé pour la production de vaccin ou pour des épreuves expérimentales, la partie des locaux affectée à ce travail doit répondre aux exigences de confinement des agents pathogènes du Groupe 4 exposées au Chapitre 1.1.2.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Quel que soit le sous-type, il est recommandé de n'utiliser, à des fins de constitution d'un lot de semence mère destiné à la production de vaccins à virus inactivés, que des virus influenza A bien caractérisés, en particulier en ce qui concerne leur faible pouvoir pathogène, et provenant de préférence d'une collection internationale ou nationale. Les virus d'IA hautement pathogène ne doivent pas être utilisés comme virus de semence de vaccins de l'IA.

b) Méthode de culture

Un lot de semence initiale est constitué et permettra de générer un lot de travail. Les lots de semence initiale et de travail sont produits sur œufs EOPS ou SAN. L'établissement d'une culture initiale peut consister en la seule production d'un volume d'au moins 100 ml de liquide allantoïdien qui peut être stocké sous formes de fractions aliquotes (0,5 ml) lyophilisées.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Après obtention, le lot de semence initial doit être vérifié au plan de la stérilité, de l'innocuité, de son activité et de l'absence d'agents étrangers.

2. Méthode de fabrication

Pour la production de vaccin, un lot de travail, à partir duquel les lots de vaccin sont produits, est d'abord constitué sur œufs embryonnés EOPS ou SAN, par multiplication d'une fraction aliquote du lot de semence initiale, en quantité suffisante pour permettre une production de 12 à 18 mois. Il est préférable de conserver le lot de travail sous forme congelée en dessous de -60°C , étant donné que les virus lyophilisés ne se multiplient pas toujours à titre élevé au premier passage suivant.

Les vaccins à virus influenza inactivés préparés à partir d'un virus non modifié sont produits sur œufs embryonnés de poule. La méthode de production consiste à multiplier le virus stérilement ; toutes les procédures étant réalisées en conditions stériles.

Il est habituel de diluer le lot de travail dans du tampon isotonique stérile (c'est-à-dire du PBS pH 7,2) de manière à ce que $10^3 - 10^4$ DIE₅₀ (doses de virus infectant 50 % des œufs) sous 0,1 ml soient inoculées dans la cavité allantoïdienne de chaque œuf embryonné EOPS ou SAN de 9 à 11 jours. Les œufs ainsi inoculés sont ensuite incubés à 37°C , ceux dont les embryons meurent dans les 24 h sont éliminés. La durée de l'incubation dépend de la souche virale utilisée et doit être optimisée pour garantir les meilleurs rendements avec le minimum de mortalité embryonnaire.

Les œufs infectés sont refroidis à 4°C avant d'être récoltés. La partie supérieure de l'œuf est enlevée et les liquides allantoïdiens sont collectés par succion. L'incorporation de tout matériel vitellin ou d'albumen doit être évitée. Tous les liquides allantoïdiens doivent être immédiatement stockés à 4°C et testés pour détecter une éventuelle contamination bactérienne.

Dans la fabrication de vaccins à virus inactivés, les liquides allantoïdiens récoltés sont traités soit par du formol (la concentration finale habituelle est de 1/1 000) soit par de la bêta-propiolactone (la concentration finale

habituelle est de 1/1 000 – 1/4 000). La durée requise doit être suffisante pour garantir l'absence de virus résiduel vivant. La plupart des vaccins à virus inactivés sont formulés avec des liquides allantoïdiens inactivés non concentrés (qui constituent le principe actif). Cependant, les principes actifs peuvent être concentrés pour une meilleure conservation de l'antigène. Le principe actif est en général émulsifié avec une huile minérale ou végétale. Les formulations précises sont en général protégées par le secret industriel.

3. Contrôles en cours de fabrication

Pour les vaccins à virus inactivés, on vérifiera que l'inactivation est bien totale en utilisant des œufs embryonnés EOPS ou SAN et en testant deux fois au moins 10 aliquotes de 0,2 ml à partir de chaque lot.

4. Contrôles des lots

La plupart des pays ont publié des spécifications concernant le contrôle en cours de production et les tests sur les vaccins, qui comprennent la définition des tests obligatoires à réaliser sur les vaccins en cours et en fin de fabrication.

a) Stérilité

Les tests vérifiant la stérilité et l'absence de contaminants dans les produits biologiques, sont décrits au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Pour les vaccins à virus inactivés, une double dose est administrée par la voie recommandée à 10 oiseaux âgés de 3 semaines ; ceux-ci sont observés pendant deux semaines pour vérifier l'absence de signes cliniques et de lésions locales.

c) Activité

L'activité d'un vaccin IA est en général évaluée en testant la capacité du vaccin à induire un titre IHA significatif chez des oiseaux EOPS ou SAN. Classiquement, un test d'activité impliquant l'utilisation de trois doses diluées et d'une épreuve avec un virus virulent (voir par exemple le Chapitre 2.3.14.) peut aussi être utilisé pour tester les vaccins visant à protéger contre les sous-types HPNAI ou LPNAI. En ce qui concerne les vaccins à virus inactivés ciblant les autres sous-types pour lesquels des virus virulents ne sont pas connus, les tests d'activité peuvent reposer sur la mesure des réponses immunitaires ou sur une épreuve suivie de l'évaluation de la morbidité et de la réduction quantitative de la réplication du virus d'épreuve au niveau de l'appareil respiratoire (oropharynx et trachée) et intestinal (cloaque). L'évaluation de la concentration antigénique en hémagglutinine (77) pourrait permettre d'extrapoler *in vitro* l'activité des lots de vaccins suivants.

d) Stabilité

Une fois stocké dans les conditions recommandées, le vaccin final devra conserver son activité pendant au moins 1 an. Les vaccins à virus inactivés ne doivent pas être congelés.

e) Agents de conservation

Il est possible d'utiliser des agents de conservation pour les vaccins formulés en doses multiples.

f) Précautions d'emploi (risques)

Le manipulateur prendra garde de ne pas s'injecter de vaccins en émulsion huileuse.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir section C.4.b ci-dessus.

b) Activité

Voir section C.4.b ci-dessus

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AGÜERO M., SAN MIGUEL E., SÁNCHEZ A., GÓMEZ-TEJEDOR C. & JIMÉNEZ-CLAVERO M.A. (2007). A fully automated procedure for the high-throughput detection of avian influenza virus by real-time reverse transcription–polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **51**, 235–241.
2. ALEXANDER D.J. (1993). Orthomyxovirus infections. *In: Viral Infections of Vertebrates, Volume 3: Viral Infections of Birds*, McFerran J.B. & McNulty M.S., eds. Horzinek M.C., Series editor. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 287–316.
3. ALTMULLER A., KUNERL M., MULLER K., HINSHAW V.S., FITCH W.M. & SCHOLTISSEK C. (1991). Genetic relatedness of the nucleoprotein (NP) of recent swine, turkey and human influenza A virus (H1N1) isolates. *Virus Res.*, **22**, 79–87.
4. ARRIOLA J.M., FARR W., URIBE G. & ZURITA J. (1999). Experiencias de campo en el uso de vacunos contra influenza aviar. *In: Proceedings Curso de Enfermedades Respiratorias de las Aves, Asociacion Nacional de Especialistas en Cienvias Avicelase*, 3–13.
5. BANKOWSKI R.A. (1982). Proceedings of the First International Symposium on Avian Influenza, 1981. Carter Comp., Richmond, USA.
6. BANKOWSKI R.A. (1985). Report of the Committee on Transmissible Diseases of Poultry and Other Avian Species. Proceedings of the 88th Annual Meeting of the U.S. Animal Health Association, 474–483.
7. BEARD C.W. (1970). Demonstration of type-specific influenza antibody in mammalian and avian sera by immunodiffusion. *Bull. WHO*, **42**, 779–785.
8. BEARD C.W., SCHNITZLEIN W.M. & TRIPATHY D.N. (1991). Protection of chickens against highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) by recombinant fowlpox viruses. *Avian Dis.*, **35**, 356–359.
9. CAPUA I. & ALEXANDER D.J. (2004). Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol.*, **33**, 393–404.
10. CAPUA I., CATTOLI G., MARANGON S., BORTOLOTTI L. & ORTALI G. (2002). Strategies for the control of avian influenza in Italy. *Vet. Rec.*, **150**, 223.
11. CAPUA I. & MARANGON S. (2000). Review article: The avian influenza epidemic in Italy, 1999–2000. *Avian Pathol.*, **29**, 289–294.
12. CAPUA I., TERREGINO C., CATTOLI G., MUTINELLI F. & RODRIGUEZ J.F. (2003). Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.*, **32**, 47–55.
13. CAPUA I., TERREGINO C., CATTOLI G. & TOFFAN A. (2004). Increased resistance of vaccinated turkeys to experimental infection with an H7N3 low-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathol.*, **33**, 47–55.
14. CHUA T-H., ELLIS T.M., WONG C.W., GUAN Y., GE S.X., PENG G., LAMICHHANE C., MALIADIS C., TAN S.-W., SELLECK P. & PARKINSON J. (2007). Performance evaluation of five detections tests for avian influenza antigen with various avian samples. *Avian Dis.*, **51**, 96–105.
15. COLLINS R.A., KO L.S., SO K.L., ELLIS T., LAU L.T. & YU A.C.H. (2002). Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (Eurasian lineage) using NASBA. *J. Virol. Methods*, **103**, 213–225.
16. COUNCIL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (1992). Council Directive 92/40/EEC of 19th May 1992 introducing Community measures for the control of avian influenza. *Off. J. European Communities*, **L167**, 1–15.
17. DAPRILE P.N. (1986). Current situation of avian influenza in Italy and approaches to its control. *In: Acute Virus Infections of Poultry*, McFerran J.B. & McNulty M.S., eds. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, 29–35.
18. DAS A., SPACKMAN E., SENNE D., PEDERSEN J. & SUAREZ D.L. (2006). Development of an internal positive control for rapid diagnosis of avian influenza virus infections by real-time reverse transcription-PCR with lyophilized reagents. *J. Clin. Microbiol.*, **44** (9), 3065–3073.
19. EUROPEAN UNION (EU) SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL HEALTH AND ANIMAL WELFARE (SCAHAW) (2003). Food Safety: Diagnostic Techniques and Vaccines for Foot and Mouth Disease, Classical Swine Fever,

- Avian Influenza and some other important OIE List A Diseases. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/sciah/out93>.
20. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED (FAO) (2004). FAO, OIE & WHO Technical consultation on the Control of Avian Influenza. Animal health special report. http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/en/health/diseases-cards/avian_recomm.html.
 21. GARCIA A., CRAWFORD J.M., LATIMER J.W., RIVERA-CRUZ E. & PERDUE M.L. (1996). Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J. Gen. Virol.*, **77**, 1493–1504.
 22. GARCIA A., JOHNSON H., KUMAR SRIVASTAVA D., JAYAWARDENE D.A., WEHR D.R. & WEBSTER R.G. (1998). Efficacy of inactivated H5N2 influenza vaccines against lethal A/chicken/Queretaro/19/95 infection. *Avian Dis.*, **42**, 248–256.
 23. GARCIA-GARCIA J., RODRIGUEZ V.H. & HERNANDEZ M.A. (1998). Experimental studies in field trials with recombinant fowlpox vaccine in broilers in Mexico. Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. U.S. Animal Health Association, 245–252.
 24. GE J., DENG G., WEN Z., TIAN G., WANG Y., SHI J., WANG X., LI Y., HU S., JIANG Y., YANG C., YU K., BU Z. & CHEN H. (2007). Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice from lethal challenge of homologous and heterologous H5N1 avian influenza viruses. *J. Virol.*, **81**, 150–158.
 25. HALVORSON D.A. (1998). Strengths and weaknesses of vaccines as a control tool. Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. U.S. Animal Health Association, 223–227.
 26. HALVORSON D.A., FRAME D.D., FRIENDSHUH A.J. & SHAW D.P. (1998). Outbreaks of low pathogenicity avian influenza in USA. Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. U.S. Animal Health Association, 36–46.
 27. HOFFMANN B., HARDER T., STARICK E., DEPNER K., WERNER O. & BEER M. (2007). Rapid and highly sensitive pathotyping of avian influenza A H5N1 virus by using real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 600–603.
 28. IMAI M., NINOMIYA A., MINEKAWA H., NOTOMI T., ISHIZAKI T., TASHIRO M. & ODAGIRI T. (2006). Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine*, **24**, 6679–6682.
 29. KO L.S., LAU L.T., BANKS J., AHERNE R., BROWN I.H., COLLINS R.A., CHAN K.Y., XING J. & YU A.C.H. (2004). Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **313**, 336–342.
 30. KODIHALLI S. & WEBSTER R.G. (1998). DNA vaccines for avian influenza – a model for future poultry vaccines? Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. U.S. Animal Health Association, 263–280.
 31. LEE C.W., SENNE D.A. & SUAREZ D.L. (2004). Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. *J. Virol.*, **78** (15), 8372–8381.
 32. LIU H.Q., PENG D.X., CHENG J., JIA L.J., ZHANG R.K. & LIU X.F. (2002). Genetic mutations of the haemagglutinin genes of H9N2 subtype avian influenza viruses. *J. Yangzhou University, Agriculture and Life Sciences Edition*, **23**, 6–9.
 33. LONDT B.Z., BANKS J. & ALEXANDER D.J. (2007). Highly pathogenic avian influenza viruses with low virulence for chickens in *in vivo* tests. *Avian Pathol.*, **36**, 347–350.
 34. LYSCHOW D., WERNER O., METTENLEITER T.C. & FUCHS W. (2001). Protection of chickens from lethal avian influenza A virus infection by live-virus vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing the haemagglutinin (H5) gene. *Vaccine*, **19**, 4249–4259.
 35. MCCAPES R.H. & BANKOWSKI R.A. (1985). Use of avian influenza vaccines in California turkey breeders – medical rationale. Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. U.S. Animal Health Association, 271–278.

36. MINISTRY OF AGRICULTURE, P.R. CHINA (2006). Poultry avian influenza vaccination in China. <http://www.agri.gov.cn/ztzl/gdztzl/P020061023368529330005.pdf>
37. MUNCH M., NIELSEN L., HANDBERG K. & JORGENSEN P. (2001). Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch. Virol.*, **146**, 87–97.
38. NAEEM K. (1998). The avian influenza H7N3 outbreak in South Central Asia. Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. U.S. Animal Health Association, 31–35.
39. NAEEM K., ULLAH A., MANVELL R.J. & ALEXANDER D.J. (1999). Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan. *Vet. Rec.*, **145**, 560.
40. NAKAYA T., CROS J., PARK M.-S., NAKAYA Y., SAGRERA A., VILLAR E., GARCIA-SASTRE A. & PALESE P. (2001). Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *J. Virol.*, **74**, 11868–11873.
41. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (2004). Chapter 2.1.14 Highly pathogenic avian influenza. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Fifth Edition. OIE, Paris, France, 258–269.
42. PASICK J., HANDEL K., ROBINSON J., COPPS J., RIDD D., HILLS K., KEHLER H., COTTAM-BIRT C., NEUFELD J., BERHANE Y. & CZUB S. (2005). Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *J. Gen. Virol.*, **86**, 727–731.
43. PRICE R.J. (1982). Commercial avian influenza vaccines. In: Proceedings of the First Avian Influenza Symposium, 1981. Carter Comp., Richmond, USA, 178–179.
44. QIAO C.L., YU K.Z., JIANG Y.P., JIA Y.Q., TIAN G.B., LIU M., DENG G.H., WANG X.R., MENG Q.W. & TANG X.Y. (2003). Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. *Avian Pathol.*, **32**, 25–31.
45. SCHILD G.C., NEWMAN R.W., WEBSTER R.G., MAJOR D. & HINSHAW V.S. (1980). Antigenic analysis of influenza A virus surface antigens: considerations for the nomenclature of influenza virus. *Arch. Virol.*, **83**, 171–184.
46. SENNE D.A., PANIGRAHY B., KAWAOKA Y., PEARSON J.E., SUSS J., LIPKIND M., KIDA H. & WEBSTER R.G. (1996). Survey of the haemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis.*, **40**, 425–437.
47. SHAFER A.L., KATZ J.B. & EERNISSE K.A. (1998). Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Type A influenza antibodies in avian sera. *Avian Dis.*, **42**, 28–34.
48. SIMS L.D. (2003) Avian influenza in Hong Kong. Proceeding of the Fifth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA, 14–17 April 2002. *Avian Dis.*, **47**, 832–838.
49. SLEMONS R.D. & BRUGH M. (1998). Rapid antigen detection as an aid in early diagnosis and control of avian influenza. In: Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. US Animal Health Association, 313–317.
50. SLEMONS R.D. & D.E. SWAYNE (1990). Replication of a waterfowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chickens. *Avian Dis.*, **34**, 277–284.
51. SLOMKA M.J., COWARD V.J., BANKS J., LÖNDT B.Z., BROWN I.H., VOERMANS J., KOCH G., HANDBERG K.J., JØRGENSEN P.H., CHERBONNEL-PANSART M., JESTIN V., CATTOLI G., CAPUA I., EJDERSUND A., THORÉN P. & CZIFRA G. (2007). Identification of sensitive and specific avian influenza PCR methods through blind ring trials in the European Union. *Avian Dis.*, **51**, 227–234.
52. SLOMKA M.J., PAVLIDIS T., BANKS J., SHELL W., McNALLY A., ESSEN S. & BROWN I.H. (2007). Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005–2006. *Avian Dis.*, **51**, 373–377.
53. SPACKMAN E., SENNE D.A., MYERS T.J., BULAGA L.L., GARBER L.P., PERDUE M.L., LOHMAN K., DAUM L.T. & SUAREZ D.L. (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3256–3260.

54. STARICK E., ROMER-OBERDORFER A. & WERNER O. (2000). Type- and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza viruses. *J. Vet. Med. [B]*, **47**, 295–301.
55. SUAREZ D. (1998). Molecular diagnostic techniques: can we identify influenza viruses differentiate subtypes and determine pathogenicity potential of viruses by RT-PCR? Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia. US Animal Health Association, Pennsylvania, USA, 318–325.
56. SUAREZ D.L., DAS A., ELLIS E. (2007). Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian Dis.*, **51**, 201–208.
57. SUAREZ D.L., SENNE D.A., BANKS J., BROWN I.H., ESSEN S.C., LEE C.W., MANVELL R.J., MATHIEU-BENSON C., MARENO V., PEDERSEN J., PANIGRAHY B., ROJAS H., SPACKMAN E. & ALEXANDER D.J. (2004). Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 693–699.
58. SWAYNE D.E. (2001). Avian influenza vaccine use during 2001. *In*: Proceedings of the 104th annual meeting of the US Animal Health Association. USAHA, Richmond, Virginia, USA, 469–471.
59. SWAYNE D.E. (2003). Vaccines for list A poultry diseases; emphasis on avian influenza. *Dev. Biol. (Basel)*, **114**, 201–212.
60. SWAYNE D.E. (2004). Application of new vaccine technologies for the control of transboundary diseases. *Dev. Biol. (Basel)*, **119**, 219–228.
61. SWAYNE D.E. & AKEY B. (2004). Avian influenza control strategies in the United States of America. *In*: Proceedings of the Frontis Workshop on Avian Influenza Prevention and Control, Wageningen, The Netherlands, 13–15 October 2003, R.S. Schrijver & Koch G., eds. <http://www.wur.nl/frontis/>.
62. SWAYNE D.E., BECK J.R. & KINNEY N. (2000). Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowl pox vaccine. *Avian Dis.*, **44**, 132–137.
63. SWAYNE D.E. & MICKLE T.R. (1997). Protection of chickens against highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus by a recombinant fowlpox vaccine. Proceedings the 100th Annual Meeting of the US Animal Health Association, Little Rock, USA, 1996, 557–563.
64. SWAYNE D.E., SENNE D.A. & BEARD C.W. (1998). Influenza. *In*: Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fourth Edition, Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E. & Reed W.M., eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania, USA, 150–155.
65. SWAYNE D.E. & SUAREZ D.L. (2000). Highly pathogenic avian influenza. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **19**, 463–482.
66. SWAYNE D.E. & SUAREZ D.L. (2001). Avian influenza in Europe, Asia and Central America during 2001. *In*: Proceedings of the 104th annual meeting of the US Animal Health Association, USAHA, Richmond, Virginia, USA, 465–470.
67. TUMPEY T.M., ALVAREZ R., SWAYNE D.E. & SUAREZ D.L. (2005). A diagnostic aid for differentiating infected from vaccinated poultry based on antibodies to the nonstructural (NS1) protein of influenza A virus. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 676–683.
68. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (1995). Memorandum No. 800.85. Avian influenza vaccines. USDA, Veterinary Biologics, Animal and Plant Health Inspection Services.
69. VAN DER GOOT, J.A., KOCH, G., DE JONG, M.C.M. & VAN BOVEN, M. (2005). Quantification of the effect of vaccination on transmission of avian influenza (H7N7) in chickens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 18141–18146.
70. VAN DER GOOT, J.A., VAN BOVEN, M., KOCH, G. & DE JONG M.C.M. (2006). Proceedings of the Joint 11th Annual Meetings of the National Laboratories for Newcastle Disease and Avian Influenza of EU Member States, VAG Uccle Brussels, 2005 pp 130-133. http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/avian/crls_proceedings_en.htm
71. VEITS J., WIESNER D., FUCHS W., HOFFMANN B., GRNZOW H., STARICK E., MUNDT E., SCHIRRMIEIER H., MEBATSION, T., METTENLEITER T.C. & ROMER-OBERDORFER A. (2006). Newcastle disease virus expressing H5

- hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 8197–8202.
72. VASFI MARANDI M., BOZORGMEHRI FARD M.H. & HASHEMZADEH M. (2002). Efficacy of inactivated H9N2 avian influenza vaccine against non-highly pathogenic A/chicken/Iran/ZMT-173/1999. *Arch. Razi Institute*, **53**, 23–32.
 73. VILLARREAL-CHAVEZ C. (2007). AI control experiences in the Americas: a regional summary. OIE/FAO Conference on Vaccination: a Tool for the Control of Avian Influenza. Presented 22 March 2007, Verona Italy.
 74. VILLAREAL-CHAVEZ C. & RIVERA CRUZ E. (2003). An update on avian influenza in Mexico. *In: Proceedings of the 5th International Symposium on Avian Influenza*. Georgia Center for Continuing Education, University of Georgia, Athens, Georgia, USA, 14–17 April 2002. *Avian Dis.*, **47**, 1002–1005.
 75. WILKINSON B.E. (1998). Recombinant hemagglutinin subunit vaccine produced in a baculovirus expression vector system. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza*, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. US Animal Health Association, 253–262.
 76. WOOD G.W., BANKS J., STRONG I., PARSONS G. & ALEXANDER D.J. (1996). An avian influenza virus of H10 subtype that is highly pathogenic for chickens but lacks multiple basic amino acids at the haemagglutinin cleavage site. *Avian Pathol.*, **25**, 799–806.
 77. WOOD J.M., KAWAOKA Y., NEWBERRY L.A., BORDWELL E. & WEBSTER R.G. (1985). Standardisation of inactivated H5N2 influenza vaccine and efficacy against lethal A/chicken/Pennsylvania/1370/83 infection. *Avian Dis.*, **29**, 867–872.
 78. WOOD G.W., MCCAULEY J.W., BASHIRUDDIN J.B. & ALEXANDER D.J. (1993). Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Arch. Virol.*, **130**, 209–217.
 79. WOOD G.W., PARSONS G. & ALEXANDER D.J. (1995). Replication of influenza A viruses of high and low pathogenicity for chickens at different sites in chickens and ducks following intranasal inoculation. *Avian Pathol.*, **24**, 545–551.
 80. WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE (1980). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum. *Bull. WHO*, **58**, 585–591.
 81. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2007). Chapter 2.7.12 Avian Influenza. *In: Terrestrial Animal Health Code*, Sixteenth Edition. OIE, Paris, France pp 279–285.
 82. ZHIGAO B. (2007). Field trials with chimera vaccines. OIE/FAO Conference on Vaccination: a Tool for the Control of Avian Influenza. Presented 22 March 2007, Verona, Italy.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour l'Influenza aviaire (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

MYCOPLASMOSE AVIAIRE

(Mycoplasma gallisepticum et M. synoviae)

RÉSUMÉ

Définition de la maladie : la mycoplasmosse aviaire est causée par plusieurs mycoplasmes pathogènes parmi lesquels, le plus important, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) et *M. synoviae* (MS), sont les plus importants ; ce sont les seuls à être inscrits sur la liste des maladies devant être notifiées à l'OIE.

Description de la maladie : MG est responsable d'une maladie respiratoire chronique chez les volailles domestiques, en particulier en présence de stress liés à la conduite d'élevage et/ou d'autres agents pathogènes respiratoires. La maladie se caractérise par du coryza, une conjonctivite, des éternuements et une sinusite, surtout chez le dindon, le gibier ou les oiseaux d'ornement. Des pertes de production, des saisies ou des déclassements à l'abattoir et des baisses de ponte peuvent en résulter. MS est responsable d'une maladie respiratoire, d'une synovite ou entraîner une infection silencieuse. L'infectiosité et la virulence des souches de MG et de MS sont variables, certaines infections étant parfois inapparentes.

Identification de l'agent pathogène : MG et MS peuvent être identifiés par des méthodes immunologiques, après isolement sur milieux spécifiques pour mycoplasmes, ou par mise en évidence de leur ADN dans les échantillons ou les cultures.

Les échantillons pour culture peuvent être des écouvillons d'organes ou de tissus, des exsudats, des homogénats dilués de tissus, des liquides aspirés des sinus infra-orbitaires ou d'articulations, ou des fragments de vitellus ou d'embryons. Les signes cliniques et les lésions orienteront le choix des échantillons. Des milieux liquides et gélosés sont utilisés pour l'isolement, mais il est en règle générale nécessaire d'obtenir des colonies sur gélose pour l'identification. Des tests biochimiques de base peuvent être utiles pour une classification préliminaire des isolats, mais l'identification finale repose sur des épreuves immunologiques, les plus satisfaisantes étant les épreuves d'immunofluorescence ou d'immuno-peroxydase.

Les méthodes de détection de l'ADN, basées sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sont utilisées dans des laboratoires spécialisés. Une fois validées, elles peuvent être utilisées sur des écouvillons ou des cultures.

Épreuves sérologiques : plusieurs épreuves sérologiques sont utilisées pour détecter les anticorps anti-MG et anti-MS, mais en raison de leurs spécificité et sensibilité variables, ils sont recommandés plus pour un dépistage de lot que pour un test individuel.

Les épreuves les plus utilisées sont l'agglutination rapide sur lame (ARL), les épreuves immuno-enzymatiques (ELISA) et l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination (IHA). Pour l'épreuve d'ARL, les sérums sont mélangés avec un antigène du commerce coloré et des sérums qui réagissent dans les 2 minutes sont chauffés 30 min à 56 °C et re-testés. Les sérums qui réagissent encore, en particulier après dilution, sont considérés positifs et testés soit avec une épreuve ELISA soit par IHA pour confirmation. Plusieurs kits de diagnostic commerciaux ELISA sont disponibles pour MG et MS.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : bien que le maintien d'élevages indemnes de MG ou de MS soit la méthode préférable de contrôle, il existe des vaccins vivants et des vaccins inactivés pour la poule. La vaccination ne doit être

envisagée que sur les sites âges-multiples quand l'infection est inévitable. Elle est en général utilisée pour éviter les pertes de production d'œufs dans les lots de poules pondeuses, mais les vaccins sont parfois aussi utilisés pour réduire la transmission par l'œuf dans les troupeaux de reproducteurs ou comme une aide à l'éradication de MG dans les sites multi-âges. Il est important de vacciner avant infection naturelle.

Les vaccins vivants disponibles sont produits à partir de la souche MG F ou plus récemment des souches ts-11 ou 6/85, qui ne sont pas pathogènes et bénéficient de meilleures caractéristiques de sécurité. Il est préférable d'administrer la souche F par voie intranasale ou par instillation oculaire, mais une administration par aérosol ou par l'eau de boisson peut être réalisée. L'instillation oculaire pour la souche ts-11 et un aérosol à fines particules pour la souche 6/85 sont recommandés. Les poulettes sont généralement vaccinées entre 12 et 16 semaines d'âge. Une dose suffit et les oiseaux vaccinés restent porteurs toute leur vie. Une utilisation à long terme de la souche F dans un site multi-âge aboutit au déplacement des souches sauvages. La souche ts-11 a été utilisée avec succès pour éradiquer la souche F dans des fermes de ponte d'âges multiples. Un vaccin vivant anti-MS a été produit à partir de la souche MS-H et est administré par instillation oculaire.

Les bactérines consistent en des suspensions concentrées de cellules de MG dans une émulsion huileuse. Elles sont administrées par voie parentérale aux poulettes de 12 à 16 semaines d'âge, habituellement par voie sous-cutanée dans le cou. Un rappel est souhaitable. Les bactérines permettent de prévenir les pertes de production d'œufs et la maladie respiratoire, mais elles n'empêchent pas l'infection par des souches sauvages de MG. Une bactérine semblable pour MS a obtenu une autorisation de mise sur le marché aux États-Unis d'Amérique mais elle n'est pas très utilisée.

A. INTRODUCTION

Mycoplasma gallisepticum (MG) et *M. synoviae* (MS) appartiennent à la classe des Mollicutes, ordre des Mycoplasmatales, famille des Mycoplasmataceae. Il faut noter cependant que *M. meleagridis* et *M. iowae* peuvent aussi provoquer des maladies chez les volailles mais MG et MS sont considérés comme les mycoplasmes les plus pathogènes ; leur répartition est mondiale.

L'infection par MG est particulièrement importante chez la poule et chez la dinde comme cause de maladie respiratoire, chute de poids et baisse de production d'œufs (3, 24). Il peut également être responsable d'infections de l'appareil respiratoire supérieur chez les oiseaux d'ornement ou le gibier. Depuis peu, MG est impliqué en Amérique du Nord dans des cas de conjonctivites chez des fringillidés (27). Chez les volailles, l'infection se transmet verticalement par les œufs infectés et horizontalement par contact étroit : les acides nucléiques de MG ont été détectés dans des échantillons de l'environnement (30). Les autres voies de transmission sont moins bien connues.

Les signes cliniques des volailles infectées par MG varient d'asymptomatiques à des signes respiratoires évidents incluant du coryza, de la toux, et des éternuements. Un exsudat nasal, des râles trachéaux et une respiration par le bec ouvert sont possibles. Une sinusite unilatérale ou bilatérale peut être observée en particulier chez les dindes ou les oiseaux d'ornement ou le gibier, et les sinus infra-orbitaires peuvent être tellement enflés que les paupières sont closes. Une conjonctivite avec un exsudat mousseux est communément relevée chez les dindes et chez les oiseaux d'ornement ou le gibier, parfois chez la poule. Chez la dinde, les plumes de l'aile sont souvent souillées du fait des mouvements des oiseaux qui cherchent à éliminer l'exsudat oculaire. Les fringillidés infectés peuvent parfois présenter des écoulements oculaire et nasal et des paupières enflées, associés à la conjonctivite.

Mycoplasma gallisepticum peut être associé à une maladie respiratoire aiguë chez la poule et chez la dinde, en particulier chez le jeune, l'espèce dinde se révélant plus sensible. La sévérité de la maladie est grandement influencée par l'intensité des infections secondaires virales comme le virus de la maladie de Newcastle ou celui de la bronchite infectieuse et/ou des bactéries comme *Escherichia coli*. Chez la dinde il existe une synergie avec l'infection par le pneumovirus aviaire. Une forme plus chronique de la maladie peut exister et causer une baisse de la production d'œufs chez les reproducteurs ou les poules pondeuses.

Les lésions du tractus respiratoire consistent initialement en un excès d'exsudat muqueux suivi d'un exsudat catarrhal et caséux qui forment des dépôts amorphes dans les sacs aériens. Chez la dinde, le gibier et les oiseaux d'ornement, les sinus infra-orbitaires enflés contiennent un exsudat muqueux à caséux.

Les maladies dues à MG ou MS chez le poulet peuvent être confondues avec des maladies respiratoires causées par d'autres agents pathogènes tels que des souches peu virulentes de maladie de Newcastle (Chapitre 2.3.14.) ou la bronchite infectieuse aviaire (Chapitre 2.3.2.). Ces virus peuvent se surajouter aux infections mycoplasmiques à MG ou MS. Les hypothèses d'infections à *Haemophilus paragallinarum* (actuellement *Avibacterium paragallinarum*) et *Pasteurella multocida* doivent également être éliminées. L'infection à MG chez la dinde peut être confondue avec l'infection par le pneumovirus aviaire et la présence de sinusites peut évoquer une infection par *Pasteurella multocida*, *Chlamydia* (Chapitre 2.3.1.) ou MS. Il convient de différencier la synovite infectieuse due à MS de l'infection par *Staphylococcus aureus* et de la tenosynovite infectieuse causée par un réovirus.

Les poulets atteints de synovite infectieuse présentent une pâleur de la crête, de la boiterie et un retard de croissance. Un gonflement peut apparaître autour des articulations. Des écoulements verdâtres contenant de grandes quantités d'urates peuvent être observés. Les articulations sont remplies d'un exsudat visqueux de couleur crème à grise qui remonte le long des gaines tendineuses ; on note aussi une hépatomégalie et une hypertrophie des reins qui sont mouchetés (17). Les symptômes et les lésions respiratoires sont semblables à ceux observés lors d'infection par MG, sauf qu'en général ils sont atténués, et qu'il existe une synergie entre MG et les autres agents pathogènes respiratoires (19). La virulence et le tropisme des souches de MS présentent une grande variabilité (18, 22, 26).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

La présence de MG ou de MS doit être confirmée par l'isolement de la bactérie dans un milieu acellulaire ou la détection de son ADN directement dans les tissus infectés ou des écouvillons d'organes. Les tests sérologiques aussi sont fréquemment utilisés pour le diagnostic. Quand les résultats sont douteux, des prélèvements sont de nouveau effectués sur les oiseaux, même si des œufs embryonnés de poule ou des poulets peuvent être inoculés avec le matériel suspect. .

1. Identification de la bactérie

- **Culture**

Des échantillons peuvent être prélevés à partir des oiseaux vivants, de cadavres récents ou de cadavres rapidement congelés. Sur les oiseaux vivants, des écouvillons de la fente palatine, de l'oropharynx, de l'œsophage, de la trachée, des yeux, du cloaque et du pénis peuvent être réalisés. Sur des oiseaux morts, des prélèvements de la cavité nasale, des sinus infra-orbitaires, de la trachée ou des sacs aériens peuvent être prélevés. Les exsudats des sinus infra-orbitaires et des articulations peuvent être aspirés.

Les échantillons peuvent également être collectés d'embryons morts dans l'œuf ou de poulets ou dindonneaux qui ont cassé leur coquille mais pas éclos. Des prélèvements peuvent être effectués sur la surface interne de la membrane vitelline, et à partir de l'oropharynx et des sacs aériens de l'embryon.

Tous les échantillons doivent être examinés dès que possible après collecte. Si un transport est nécessaire, de petits fragments de tissus doivent être placés dans du milieu pour mycoplasmes ou des écouvillons doivent être déchargés par agitation vigoureuse dans 1 à 2 ml de milieu pour mycoplasmes, puis retirés. L'autre solution consiste à imbiber les écouvillons de milieu pour mycoplasmes avant de collecter les échantillons (36) puis à les remettre dans le tube pour le transport. De la glace ou d'autres moyens de réfrigération doivent être utilisés car MG et MS meurent rapidement à température ambiante. Des dilutions en série des échantillons dans un bouillon de mycoplasme sont parfois utiles car la présence d'anticorps spécifiques ou d'antibiotiques ou de substances inhibitrices dans les tissus, s'ils ne sont pas éliminés par dilution, peut inhiber la croissance des mycoplasmes.

Plusieurs milieux de culture convenables ont été décrits (10) et ceux qui sont satisfaisants pour l'isolement des mycoplasmes de volailles peuvent être achetés auprès de *Mycoplasma Experience*, *Reigate*, *Surrey*, Royaume-Uni. Les milieux pour mycoplasmes contiennent un extrait protéique et un extrait de viande supplémenté avec du sérum ou une fraction sérique, des extraits de levure, du glucose et des inhibiteurs de bactéries. Il est important que chaque nouveau lot de milieu soit validé avec des cultures de souches de MG récemment isolées et ayant un faible nombre de passages *in vitro* parce que la capacité de certains composants, en particulier l'extrait de levure et le sérum, à permettre la croissance des mycoplasmes peut varier.

Le milieu décrit par Frey *et al.* est largement utilisé aux États-Unis d'Amérique (USA) et dans d'autres pays pour l'isolement de MG et MS (2, 11). Le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) est un facteur de croissance pour le premier isolement de MS, mais il peut être omis du milieu pour la culture de MG.

Les milieux suivant liquides ou gélosés sont également satisfaisants :

- Partie A : base pour *Pleuropneumoniae like organism* (PPLO) sans cristal violet (Difco) (14,7 g) ; eau distillée ou déionisée (700 ml).
- Partie B : sérum de porc (chauffé à 56 °C pendant 1 h) (150 ml) ; extrait frais de levure à 25 % (p/v) (100 ml) ; solution de glucose à 10 % (p/v) (10 ml) ; acétate de thallium à 5 % (p/v) (10 ml), solution de pénicilline G à 200 000 unités internationale (UI)/ml (5 ml) et solution de rouge de phénol à 0,1 % (p/v) (20 ml). L'acétate de thallium peut être toxique pour les hommes et il convient de prendre des précautions lors de son usage. Le pH est ajusté à 7,8. Le sérum de porc peut être remplacé par du sérum de cheval, mais il est important de vérifier qu'il permet la croissance de MG.

La partie A est autoclavée à 121 °C sous une pression d'une atmosphère, pendant 15 min et après refroidissement est ajoutée à la partie B, qui a au préalable été stérilisée par filtration.

Pour obtenir le milieu gélosé, 10 g d'agar pur, validé pour la culture de MG, sont ajoutés à la partie A décrite ci-dessus. Le mélange est autoclavé comme décrit précédemment et conservé au bain-marie à 56 °C. Les constituants de la partie B, sauf le rouge de phénol, sont mélangés séparément, puis incubés à 56 °C. Les parties A et B sont mélangées délicatement pour éviter la formation de bulles d'air puis sont réparties dans des boîtes de Petri de 50 mm de diamètre, à raison de 7 à 9 ml par boîte. L'excès d'humidité peut être éliminé par une courte incubation à 37 °C. Les boîtes sont ensuite stockées à l'abri de l'air à environ 4 °C pendant au maximum 2 semaines.

L'extrait frais de levure est disponible dans le commerce, mais il est préférable de le préparer au laboratoire à partir de levure de boulangerie (250 g) suspendue dans de l'eau distillée (1 litre). Le mélange est porté à ébullition, refroidi puis centrifugé pendant 20 min à 3 000 g. Le surnageant est laissé à décanter puis son pH est ajusté à 8,0 avec de la soude NaOH 0,1M. Il est clarifié par centrifugation ou par filtration puis stérilisé par filtration. L'extrait est conservé à –20 °C. Le glucose (en qualité de réactif) (10 g) est dissous dans de l'eau distillée ou déionisée (100 ml) et le pH est ajusté à 7,8-8 avec du NaOH 0,1 M. Il est stérilisé par filtration et conservé à 4 °C. L'acétate de thallium (en qualité de réactif) (5 g) est dissous dans de l'eau distillée ou déionisée (100 ml), stérilisé par filtration et conservé à –20 °C. La solution de pénicilline (10⁶ UI de benzyl pénicilline dans 5 ml d'eau distillée) est conservée à 4 °C et se conserve une semaine. Pour isolement à partir d'échantillons fortement contaminés, la concentration de pénicilline peut être augmentée à 2 000 UI/ml ou de l'ampicilline (0,5 à 1 mg/ml) peut être utilisée à la place. Le rouge de phénol (0,1 g) est broyé dans du NaOH 0,1 M (2,8 ml) puis le volume est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée stérile, le mélange est ensuite autoclavé à 115 °C sous une pression d'une atmosphère pendant 30 min, puis conservé à 4 °C (NB : l'acétate de thallium est hautement toxique et la préparation de la solution-mère doit être réalisée avec une grande prudence).

Les échantillons sont ensemencés sur les géloses et dans les milieux. Les milieux solides peuvent permettre la détection de colonies de mycoplasmes à croissance lente, qui sont supplantés par la croissance rapide de saprophytes en bouillon. Il peut être nécessaire de réaliser des dilutions jusqu'à 10⁻³ pour permettre l'isolement. Les géloses ensemencées sont incubées à 37 °C dans des récipients étanches. L'augmentation de l'humidité et du taux de CO₂ dans l'atmosphère peut améliorer la croissance ; ces conditions peuvent être obtenues par l'introduction de papier ou de coton imbibé et d'un mélange d'azote et de 5 à 10 % de CO₂ dans le container ou l'inclusion d'une bougie allumée ou l'utilisation d'une étuve à CO₂ ou d'un système adéquat de production de gaz.

Les bouchons des tubes ou flacons de milieux de culture doivent être bien fermés avant incubation à 37 °C pour éviter toute modification de pH inopinée. Pendant les premiers jours la présence de colonies est recherchée quotidiennement à l'aide d'une loupe binoculaire. Par la suite les boîtes sont examinées moins fréquemment. Les cultures à partir d'échantillons du terrain ne doivent pas être considérées comme négatives avant au moins 20 jours.

L'acidification du milieu liquide doit être recherchée quotidiennement et est indiquée par un virage du rouge à l'orange ou au jaune de l'indicateur coloré. Si une croissance est observée, le bouillon est ensemencé sur gélose immédiatement. S'il n'y a pas de changement de couleur, une subculture sur milieu gélosé est réalisée après 7 à 10 jours ou plus tôt car la présence de mycoplasmes hydrolysant l'arginine (donc alcalinisant) peut masquer le changement de couleur produit par MG.

Les colonies mycoplasmiques sur gélose sont en règle générale faciles à reconnaître, bien qu'elles puissent parfois ne pas avoir l'aspect typique « en œuf sur le plat ». Des colonies bactériennes peuvent apparaître au premier passage, mais elles sont souvent plus pigmentées et disparaissent après passage sur milieu pour mycoplasmes.

Les tests biochimiques (par exemple fermentation du glucose et absence d'hydrolyse de l'arginine) peuvent être utiles pour l'identification, mais ils ne sont pas spécifiques de MG ou de MS, et nécessitent une purification de la culture par clonage.

Les méthodes immunologiques et de détection de l'ADN peuvent être utilisées pour identifier les isolats mycoplasmatiques. Elles comprennent les épreuves d'immunofluorescence indirecte (IFI) et d'immunoperoxydase (IP) qui sont simples, sensibles, spécifiques et rapides à exécuter, les épreuves d'inhibition de croissance (IC) et d'inhibition du métabolisme (IM). Des cultures purifiées (clonées) sont nécessaires pour les épreuves d'IC et d'IM mais pas pour les épreuves d'IF ou d'IP. L'IF et l'IP peuvent détecter la présence de plusieurs espèces de mycoplasmes car les colonies spécifiques de l'antisérum réagiront, mais non les autres. Cependant *M. imitans*, une espèce qui est sérologiquement proche de MG et qui possède les mêmes caractères biochimiques, a été isolée chez les canards, les oies et d'autres espèces d'oiseaux non domestiques dans certains pays. Elle peut être différenciée de MG par un test de PCR-RFLP (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction [RFLP] après une amplification en chaîne par polymérase [PCR]) comme décrit par Kempf (16). Ou bien, les colonies de l'isolat peuvent être examinées par immunofluorescence en utilisant des dilutions en série des antisérums spécifiques de MG et *M. imitans* en parallèle. Le sérum homologue doit avoir un titre considérablement plus élevé.

Les méthodes de détection de l'ADN pour identification de MG ou de MS directement dans les tissus ou pour l'identification des isolats de laboratoire sont développées ci-dessous et sont généralement basées sur la PCR.

Dans certaines circonstances, lorsque les résultats des méthodes ci-dessus ne permettent pas de conclure, l'inoculation d'embryons de poulet ou les bio-essais sur poussins vivants peut être appropriés. Cependant ces méthodes nécessitent du temps, sont coûteuses et tendent à être remplacées par la technologie PCR, bien qu'elles restent un outil précieux pour la recherche. Les échantillons nécessaires pour l'inoculation aux embryons de poulet sont les mêmes que ceux utilisés pour l'inoculation de milieux artificiels. Ils sont préparés à partir de milieu sans acétate de thallium, incubés pendant 30 à 60 min à 37 °C, puis un aliquot de 0,05 à 0,1 ml est inoculé dans le sac vitellin de plusieurs embryons de 6 à 8 jours d'incubation, issus de lots de reproducteurs indemnes de mycoplasmes. Les œufs sont mirés tous les jours et les embryons qui meurent dans les 24 h après inoculation sont écartés. Tous les autres embryons qui meurent ensuite sont placés au réfrigérateur jusqu'à la mise en culture, et ceux qui survivent après 5 jours sont placés à 4 °C pendant 4 h pour les tuer et réduire les hémorragies lors de l'ouverture. Le vitellus est ensemencé dans le milieu liquide et sur milieu gélosé. Les lipides du vitellus tendent à masquer les colonies, et il est donc essentiel de déposer le vitellus en couche très fine, ou mieux, de le diluer d'abord dans du milieu pour mycoplasmes.

Les épreuves biologiques peuvent être réalisées en préparant un homogénat de matériel suspect qui sera inoculé à au moins 4 poulets sensibles de 8 à 16 semaines, indemnes de mycoplasmes. Le diagnostic est confirmé par le réisolement du mycoplasme à partir de ces oiseaux, la démonstration de la présence de son ADN et/ou la mise en évidence d'anticorps spécifiques (28).

- **Méthodes immunologiques**

Les épreuves d'immunofluorescence et d'IP pour le diagnostic sont en règle générale utilisées pour des isolats de laboratoire plutôt que directement sur des exsudats ou des tissus infectés. Ceci parce que les micro-organismes sont trop petits pour être observés de façon concluante à l'aide du microscope optique et parce qu'il est peu probable de pouvoir avoir les échantillons correspondants de tissus ou d'exsudats de témoin positif et négatif.

- a) **Épreuve d'immunofluorescence indirecte**

La technique recommandée pour l'épreuve d'IFI (31) nécessite une culture sur gélose de l'isolat à identifier, avec de nombreuses petites colonies distinctes, une culture d'une souche connue de MG ou de MS comme témoin positif, et une culture d'une autre espèce mycoplasmatique comme *M. gallinaceum* ou *M. gallinarum* comme témoin négatif. Il faut également un sérum de lapin polyclonal anti-MG ou anti-MS, un sérum de lapin normal, et un conjugué marqué par un fluorochrome anti-immunoglobuline de lapin. Les sérums peuvent être préparés chez d'autres espèces que le lapin, mais des anticorps monoclonaux (AcM) ne devraient pas être utilisés parce que MG ou MS présente une expression variable de ses épitopes de surface et un AcM risquerait de ne pas reconnaître le micro-organisme. Les dilutions appropriées du sérum anti-MG ou anti-MS et du conjugué dilués en solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS ; 0,01 M, pH 7,2) sont d'abord déterminées par titration en échiquier, et les dilutions d'emploi sont sélectionnées en prenant les dilutions de 1/2 à 1/4 inférieures aux dilutions limites réelles. Ces dilutions sont appliquées sur les colonies de mycoplasmes à identifier, qui ont auparavant été obtenues sur géloses comme indiqué plus haut.

- **Protocole**

- i) Couper des blocs de gélose portant des colonies d'environ 1,0 × 0,5 cm, les placer sur une lame de microscope marquée avec les colonies orientées vers le haut ;
- ii) Pour permettre l'orientation du bloc par la suite, couper le coin inférieur droit des blocs. Un bloc avec l'isolat inconnu, un bloc avec la culture connue de MG, un bloc avec la culture connue de MS et un bloc avec la culture d'un autre mycoplasme différent, mais connu sont placés sur une lame. Un bloc avec l'isolat inconnu est placé sur une autre lame ;
- iii) Déposer une goutte du sérum anti-MG (ou anti-MS) convenablement dilué à la surface de chaque bloc de la première lame et une goutte de sérum de lapin normal sur le seul bloc de la seconde lame ;
- iv) Incuber tous les blocs pendant 30 min à température ambiante en atmosphère humide ;
- v) Placer chaque bloc dans un tube numéroté contenant du PBS pH 7,2 et faire un lavage pendant 10 min par rotation sur un agitateur rotatif, puis laver de nouveau et déposer de nouveau les blocs sur les lames de microscope ;
- vi) Éliminer l'excès d'humidité à l'aide de matière absorbante sur le côté des blocs. Ajouter une goutte de conjugué dilué sur chacun des blocs, et incuber et laver comme précédemment ;
- vii) Déposer les blocs sur les lames et examiner les colonies à l'aide de la source incidente de lumière d'un microscope à épifluorescence.

L'interprétation des résultats est subjective et nécessite une certaine habitude ; la comparaison avec les témoins est essentielle et ceux-ci doivent donner les réactions attendues.

Certains laboratoires utilisent un antisérum conjugué à la fluorescéine pour l'épreuve d'immunofluorescence directe (IFD). Une technique qui est largement utilisée pour l'IFD est celle dans laquelle les réactifs sont appliqués successivement à l'intérieur de cylindres d'acier inoxydable placés sur la boîte de gélose avec les colonies (32). Bien que cela soit rapide et facile à réaliser, les résultats obtenus sont moins spécifiques que par la méthode indirecte, qui de ce fait est préférée.

b) Épreuve d'immunoperoxydase indirecte

Cette épreuve est basée sur un principe similaire à celui de l'IFD à ceci près que la fixation des anticorps spécifiques aux colonies *in situ* est détectée en ajoutant un conjugué anti-immunoglobulines de lapin marqué par l'enzyme peroxydase. Une réaction positive se développe ensuite lorsqu'on ajoute un substrat approprié, qui une fois oxydé, produit des colonies colorées. Une épreuve d'immuno-empreinte (ou *Immunobinding*) peut également être utilisée et consiste à appliquer les colonies à identifier sur un filtre de nitrocellulose (21) qui est ensuite traité de manière similaire. Comme pour le test d'IFI, un sérum polyclonal doit être utilisé pour sérotyper les isolats par IP. L'avantage de l'épreuve d'IP par rapport à l'épreuve d'IFI est que l'épreuve d'IP ne nécessite pas un coûteux microscope à fluorescence.

c) Épreuve d'inhibition de croissance

Dans l'épreuve d'IC, la croissance des mycoplasmes est inhibée par un antisérum spécifique, ce qui permet l'identification de l'espèce. Cette épreuve est relativement peu sensible et les sérums doivent être de titre élevé, monospécifiques, et préparés sur mammifères car les sérums de volailles n'inhibent pas toujours suffisamment la croissance des mycoplasmes. Le micro-organisme à tester doit être en culture pure (cloné), et plusieurs dilutions doivent être testées ; une concentration de 10⁴ unités formant colonies (UFC/ml) est optimale. La vitesse de croissance du micro-organisme peut influencer l'inhibition de croissance et il est judicieux de retarder la croissance au départ en incubant à 27 °C pendant 24 h, puis de poursuivre ensuite l'incubation à 37 °C. Les détails de l'épreuve et de son interprétation sont publiés par ailleurs (6).

- **Méthodes de détection des acides nucléiques**

Une alternative aux méthodes conventionnelles de culture et d'identification est l'utilisation des méthodes de détection spécifique de l'ADN. MG ou MS peuvent être détectés par hybridation avec des sondes ADN spécifiques, mais il est maintenant beaucoup plus commun d'utiliser la PCR pour amplifier des fragments spécifiques de l'ADN présent dans l'échantillon. Au moins un kit de diagnostic commercial pour MG réalise une PCR sur le matériel directement extrait des écouvillons. Une société commerciale produit un kit de diagnostic qui détecte les souches de MG sauvages et un autre qui identifie la souche vaccinale F. Plusieurs épreuves « faites maison » ont également été publiées pour MG dont une PCR multiplexe qui est conçue pour détecter les quatre mycoplasmes pathogènes des volailles (34), mais qui n'a pas été validée avec des échantillons cliniques. Plusieurs méthodes sont citées par Kempf (16) et, en outre, un manuel publié par Lauerman (23) décrit un essai de PCR validé pour MG, MS et d'autres mycoplasmes de volailles, basé sur des séquences présentes dans le gène ARNr 16S. Cette méthode pour MG est présentée ci-dessous. Aux États-Unis, une PCR basée sur le gène

mgc2 de MG (12) ou sur le gène *vlhA* de MS (14) est devenue d'usage fréquent, car l'identification préliminaire des souches peut être réalisée par le séquençage du produit de PCR ; il convient de rappeler que des souches sans aucune parenté peuvent partager la même séquence.

a) Isolement de l'ADN

L'ADN est extrait des écouvillons (3 à 5 qui peuvent être rassemblés), suspendus dans 1 ml de PBS (qualité PCR) dans un tube Ependorf de 1,5 ml. La suspension est centrifugée pendant 30 min à 14 000 *g* à 4 °C. Le surnageant est délicatement ôté à l'aide d'une pipette Pasteur et le culot est suspendu dans 25 µl d'eau (qualité PCR). Le tube et son contenu sont portés à ébullition pendant 10 min puis placés dans la glace pendant 10 min avant centrifugation à 14 000 *g* pendant 5 min. L'ADN est dans le surnageant.

b) Amorces

Les amorces MG possèdent les séquences suivantes :

MG-14F : 5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3'

MG-13R : 5'-GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3'

Les amorces MS possèdent les séquences suivantes :

MS-F : 5'-GAG-AAG-CAA-AAT-AGT-GAT-ATC-A-3'

MS-R : 5'-CAG-TCG-TCT-CCG-AAG-TTA-ACA-A-3'

c) Réaction d'amplification en chaîne

Le mélange de réaction doit être préparé dans un local séparé et propre en utilisant un jeu de pipettes dédiées. Pour une réaction de PCR de 50 µl, le mélange est le suivant :

H ₂ O ultrapure	35,75 µl
Tampon de PCR × 10	5,00 µl
dNTP (10 mM)	1,00 µl
Amorce F (20 pmole/µl)	0,50 µl
Amorce R (20 pmole/µl)	0,50 µl
Taq (5 U/µl)	0,25 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,00 µl

Un volume de 45 µl du mélange est distribué dans chaque tube de PCR. Le mélange doit être recouvert de quelques gouttes d'huile minérale de faible densité sauf si le thermocycleur est équipé d'un couvercle chauffant. Les tubes sont ensuite apportés dans une autre zone propre où l'ADN de l'échantillon approprié (5 µl) est ajouté à chaque tube. Des témoins positif et négatif doivent être inclus à chaque série.

Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur pour les cycles suivants : 40 cycles : 94 °C pendant 30 s, 55 °C pendant 30 s, 72 °C pendant 60 s, 1 cycle (élongation finale) : 72 °C pendant 5 min et maintien à 4 °C.

d) Électrophorèse

Les produits de PCR sont détectés par électrophorèse sur gel d'agarose classique à 2 %, en incluant des marqueurs de taille appropriée, suivie d'un examen sous lumière UV. La taille du produit PCR pour MG est de 185 pb. La visualisation des produits amplifiés devrait être réalisée dans une zone séparée du laboratoire, à l'écart des autres étapes de la procédure PCR.

Les tests PCR tendent encore à être réalisés par des laboratoires spécialisés et devraient probablement être considérés comme des suppléments aux méthodes actuelles de diagnostic une fois que leur validité est fermement établie. Un grand soin doit être pris pour éviter la contamination des échantillons par l'ADN de MG ou de MS provenant de locaux voisins consacrés à l'autopsie, de salles où se réalisent des cultures ou de salles où des PCR ont déjà été effectuées à partir de prélèvements positifs (voir le Chapitre 1.1.5., « Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses », pour les mesures appropriées à prendre). Cependant, le kit de diagnostic commercial mentionné plus haut est maintenant autorisé par le département de l'agriculture des

États-Unis d'Amérique (USDA, *United States Department of Agriculture*) comme méthode de diagnostic et son autorisation approuvée dans le cadre du plan national d'amélioration de l'aviculture (NPIP, *National Poultry Improvement Plan*). Il convient de souligner que les épreuves de PCR ne sont pas validées pour la détection de l'infection chez les poussins d'un jour.

Des méthodes moléculaires sont aussi disponibles pour la différenciation des souches de MG ou MS (16) mais leur usage est pour le moment restreint à des laboratoires spécialisés. Une méthode précise et rapide de « fingerprinting » de l'ADN utilise une PCR avec des amorces randomisées ou de l'ADN polymorphique amplifié (RAPD pour *random amplified polymorphic DNA*). Cette technique utilise de courtes amorces qui donnent des profils reproductibles en gels d'agarose (8). Elle est simple et rapide et s'est révélée utile pour l'identification rapide des souches de MG lors d'études épidémiologiques. Cependant, la reproductibilité peut poser problème, et il faut donc que les souches à comparer soient traitées sur le même gel. De même, l'interprétation des profils de bandes qui semblent identiques peut être difficile.

Le séquençage des gènes-cibles quand on effectue une PCR avec des amorces pour les gènes *mgc2*, *gapA*, *pvpA* et *MGA 0309* de MG constitue une méthode précise et reproductible pour typer les souches, qui devrait permettre des comparaisons entre laboratoires (9). L'identification préliminaire des souches, lors d'une PCR avec les amorces qui ciblent les gènes *mgc2* de MG et *vlhA* de MS, est possible par le séquençage des produits de PCR sans que l'isolement du micro-organisme ne soit nécessaire (14, 15). Cependant, des souches non apparentées ont parfois des séquences identiques, lorsque l'on utilise ces amorces et une caractérisation supplémentaire est nécessaire.

2. Épreuves sérologiques

Les épreuves sérologiques d'usage courant peuvent manquer de spécificité et/ou de sensibilité. Leur utilisation est fortement recommandée pour la surveillance des élevages plutôt que pour tester un oiseau en particulier. Les responsables de diagnostic souhaitant utiliser ces épreuves devraient tester la sensibilité et la spécificité d'une épreuve (Chapitre 1.1.4., « Principes de validation des méthodes de diagnostic des maladies infectieuses ») dans les conditions de leur propre laboratoire. Il faut également noter que ces épreuves n'ont pas été validées pour des sérums d'oiseaux de gibier ou d'ornement d'un jour (4).

Les épreuves les plus utilisées sont les épreuves d'agglutination rapide sur lame (ARL), immuno-enzymatique (ELISA) ou d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) bien que d'autres aient été décrites telles que le radio-immuno-essai, la micro-immunofluorescence et l'épreuve d'IP. Le nombre de sérums à tester dans un troupeau dépend du niveau de détection et de l'intervalle de confiance désiré. Des minimums peuvent être requis pour le commerce international et la fréquence des épreuves peut aussi être stipulée comme dans le cadre de la directive du Conseil des Communautés Européennes 90/539/CEE. Des exigences de nombre et les épreuves approuvées ont également été établies pour les membres du NPIP aux USA.

Les compagnies avicoles qui utilisent l'ELISA pour analyser de nombreux sérums vis-à-vis des anticorps antiviraux peuvent souhaiter utiliser ces épreuves pour le dépistage des mycoplasmoses aviaires. La technologie ELISA ne sera pas décrite en détail ici parce qu'il existe de nombreux kits dans le commerce. Par contre, les détails de la méthode d'IHA sont donnés car les réactifs pour cette épreuve ne sont pas largement commercialisés.

a) Épreuve d'agglutination rapide du sérum

Les sérums sont prélevés à partir d'un échantillon du troupeau, et s'ils ne sont pas testés immédiatement, ils sont stockés à 4 °C et non congelés. L'épreuve doit être réalisée à température ambiante (20 à 25 °C) dans les 72 h suivant le prélèvement et les réactifs doivent aussi être à température ambiante. Une centrifugation préalable réduira les réactions non-spécifiques. Les réactifs pour ARL sont disponibles dans le commerce mais leur spécificité et leur sensibilité peuvent varier en fonction des fabricants et des lots. Ils doivent être conservés dans les conditions précisées par le fabricant. Des antigènes colorés pour l'ARL peuvent être préparés au laboratoire en utilisant des cultures telles que décrit dans la section B1. Elles sont ensuite colorées avec le colorant cristal violet. Les normes s'appliquant pour le contrôle de qualité des antigènes mycoplasmatiques pour épreuves sérologiques sont décrites ci-dessous.

- **Protocole (1)**

- i) Déposer un volume (environ 0,02 ml) de sérum sur une plaque blanche propre ou une lame de verre puis un volume d'antigène coloré de MG ou de MS. Ne pas laisser le sérum sécher avant le dépôt de l'antigène. Il est important d'agiter vigoureusement et fréquemment le flacon d'antigène pendant l'utilisation de façon à conserver une quantité correcte d'antigène en suspension.

- ii) Utiliser une baguette pour agiter et pour étaler le mélange sur une surface circulaire d'environ 1,5 cm de diamètre. Agiter la plaque ou la lame pendant 2 min. Une agglutination est indiquée par la floculation de l'antigène dans les 2 min.
- iii) Inclure des témoins positif et négatif dans l'épreuve.
- iv) Tester de nouveau des dilutions des sérums qui agglutinent, après chauffage à 56 °C pendant 30 min. S'ils réagissent encore fortement, ils sont considérés comme positifs surtout s'ils agglutinent après dilution (au 1/4 ou plus).

Aux États-Unis, des sérums de référence positifs vis-à-vis de MG et de MS peuvent être obtenus auprès des laboratoires des services nationaux vétérinaires (NVSL, *National Veterinary Services Laboratories*) de l'USDA, et en Europe auprès de l'Afssa, site de Ploufragan¹, France. Les souches MG et MS et des sérums témoins produits sur poules et sur dindes et de différents titres peuvent être achetés. Des antisérums peuvent également être achetés au département de médecine aviaire de l'Université de Georgia (Department's of Avian Medicine) (États-Unis d'Amérique), en fonction des disponibilités.

Il n'y a pas de règle unanimement admise pour l'interprétation de ces épreuves, mais une grande proportion de sérums positifs dans un lot (10 % ou plus) indique une infection par MG, surtout en cas de confirmation par une épreuve d'IHA ou ELISA. Pour confirmation, le lot peut être testé de nouveau après un mois. Des résultats non concluants doivent entraîner la recherche de MG par culture ou la mise en évidence de son ADN. Des résultats douteux pour MG ou MS doivent susciter la réalisation d'épreuves avec l'antigène MS et vice-versa, car l'infection avec ces mycoplasmes provoque des réactions croisées.

Les épreuves peuvent être réalisées sur le vitellus comme sur le sérum bien que le vitellus doive d'abord être dilué ou extrait.

b) Épreuve d'inhibition de l'hémagglutination

MG et MS sont capables d'hémagglutiner les globules rouges de volailles et des anticorps sériques spécifiques peuvent inhiber l'hémagglutination. Une souche poussant bien et hémagglutinant de façon régulière doit être sélectionnée. L'épreuve d'IHA nécessite un antigène MG ou MS hémagglutinant correctement, des globules rouges frais et lavés de poulet ou de dinde en fonction des cas, et le sérum à tester. L'antigène peut être soit une culture fraîche soit une suspension lavée concentrée de mycoplasme dans du PBS. Il peut être difficile de maintenir un stock d'antigène de titre élevé sous forme de culture. Cependant l'utilisation d'antigène concentré (contenant en général 20 à 50 % de glycérol et conservé à -70 °C) augmente les risques de réaction non spécifiques. Aux USA, des antigènes MG et MS hémagglutinants (HA) peuvent être achetés auprès des NVSL.

L'épreuve d'IHA suit des procédures bien connues (1). Le titre hémagglutinant de l'antigène est d'abord déterminé selon des dilutions de deux en deux, l'unité hémagglutinante étant définie comme la plus petite quantité d'antigène capable de donner une hémagglutination complète dans les conditions de l'épreuve utilisée. L'épreuve d'IHA doit être réalisée avec 4 unités hémagglutinantes selon la méthode suivante ou une méthode dont la sensibilité a été démontrée équivalente à l'aide de sérums positifs connus.

Les épreuves de dosage des HA et d'IHA sont réalisées dans des plaques de plastique avec des cupules en V sous un volume constant de 50 µl. Un sérum témoin positif et un sérum témoin négatif sont inclus à chaque série d'épreuve. Une rangée de 8 puits est utilisée pour chaque sérum à tester.

• Protocole

- i) Déposer 50 µl de PBS dans le premier puits de chaque rangée ;
- ii) Ajouter 8 unités hémagglutinantes sous un volume de 50 µl dans le deuxième puits de chaque rangée et 4 unités HA (UHA) sous un volume de 50 µl dans les puits 3 à 8 ;
- iii) Ajouter 50 µl d'une dilution au 1/5 du sérum à tester préalablement préparée, dans le premier puits, mélanger et transférer 50 µl dans le deuxième puits et ainsi de suite et rejeter 50 µl du dernier puits. Le premier puits sert au sérum témoin ;
- iv) Six puits sont nécessaires pour le contrôle de l'antigène. Ajouter 50 µl de PBS dans les puits 2 à 6 inclus, et ajouter 50 µl de l'antigène titrant 8 UHA dans les puits 1 et 2. Mélanger le contenu du puits 2 et transférer 50 µl au puits 3, mélanger et répéter jusqu'au puits 6 et rejeter 50 µl ;
- v) Deux puits sont nécessaires pour le contrôle des globules rouges. Ajouter 50 µl de PBS à chacun de ces puits ;

1 Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) Ploufragan, Unité de mycoplasmatologie bactériologie, 22440 Ploufragan, France.

- vi) Ajouter 50 µl d'une suspension de globules rouges à 0,5 % (globules rouges de poulet pour des sérums de poulet, globules rouges de dindes pour des sérums de dindes) dans chaque puits ;
- vii) Agiter doucement la plaque pour assurer le mélange du contenu des puits, et lire après environ 50 min d'incubation à température ambiante ou quand le titre de l'antigène est 4 UHA. Pour la lecture, la plaque doit être inclinée et seuls les puits dans lesquels les globules rouges « descendent » (sédimentent) comme les globules rouges des puits témoins globules rouges doivent être considérés comme inhibés. Le sérum témoin doit montrer un net bouton de globules rouges et les témoins positifs et négatifs doivent être conformes. Le titre du sérum est la plus forte dilution du sérum montrant une inhibition complète de l'HA.

Les sérums donnant une hémagglutination non spécifique doivent être adsorbés pour éliminer les hémagglutinines non spécifiques de façon à ce qu'un net bouton de sédimentation des globules rouges soit visible dans le puits sans antigène HA. L'adsorption est pratiquée en incubant 1 ml de la dilution du sérum avec 6 à 8 gouttes d'une suspension de globules rouges de poulet ou de dindes lavés et concentrés. Les cellules sont éliminées après incubation à 37 °C pendant 10 min, et l'activité hémagglutinante du surnageant est testée.

Il n'y a pas de définition officielle des résultats positifs ou négatifs pour le commerce international mais le NPIP aux USA stipule que des titres de 1/80 ou plus sont considérés comme positifs et des titres de 1/40 sont fortement suspects.

c) Méthode immuno-enzymatique

Plusieurs kits de diagnostic ELISA pour la recherche des anticorps anti-MG ou anti-MS sont commercialisés. La sensibilité est déterminée dans une certaine mesure par les recommandations du fabricant pour le seuil des réactions positives ou douteuses. La sensibilité peut parfois être volontairement diminuée pour éviter les réactions croisées bien connues entre MG et MS. Un ELISA utilise un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope correspondant à un polypeptide de 56 kDa de MG (7). Dans ce système, les plaques ELISA sont sensibilisées avec un antigène cellulaire total de MG et les sérums à tester sont déposés comme dans une épreuve conventionnelle indirecte, mais la réaction est mesurée en fonction de la capacité de blocage de la fixation de l'anticorps monoclonal marqué. Un kit de diagnostic ELISA pour MS a aussi été mis sur le marché. L'avantage est que le test peut être utilisé avec des sérums de toutes espèces aviaires sans adaptation.

- **Contrôle de qualité des antigènes *Mycoplasma gallisepticum* et *M. synoviae***

- i) **Antigènes *Mycoplasma gallisepticum***

Les antigènes sont généralement préparés à partir de la souche de MG, S6 ou A5969. Des antigènes préparés à partir d'autres souches peuvent également être utilisés quand nécessaire.

*Antigène *Mycoplasma gallisepticum* pour ARL* : les méthodes de contrôle de qualité décrites ci-dessous s'appliquent uniquement à des suspensions de MG colorées avec un colorant adéquat, contenant des agents de conservation et préparées en vue d'épreuves d'agglutination rapide sur lame avec des sérums. De tels antigènes sont disponibles dans le commerce.

À l'examen microscopique, l'antigène doit paraître comme une suspension homogène sans floccules ni précipités et le liquide de suspension ne doit pas contenir de résidus de colorant. Il doit être indemne de contamination bactérienne ou fongique. Le pH doit se situer entre 6,5 et 7. Il doit être conservé à 5 ± 3 °C et être réchauffé à température ambiante avant utilisation.

La sensibilité et la spécificité de l'antigène sont déterminées selon les résultats obtenus avec des sérums positifs connus de titres élevés ou faibles et des sérums négatifs connus. Une réaction est positive quand il y a formation de flocculats colorés et éclaircissement du mélange. Les critères définis ci-dessus sont applicables jusqu'à la date de péremption définie par le fabricant.

Antigène MG pour l'épreuve d'IHA : l'épreuve est pratiquée de préférence avec des cultures fraîches en phase de croissance. L'antigène doit être indemne de contamination bactérienne ou fongique.

Antigène MG pour l'ELISA : il peut être difficile de préparer un antigène pour un test ELISA indirect sans expérimentation préalable et confirmation de sa sensibilité et spécificité. L'utilisation de kits commerciaux fiables est sans doute la meilleure stratégie pour la plupart des laboratoires de diagnostic. Certains kits sont maintenant reconnus par l'USDA et leur utilisation dans le cadre du NPIP approuvée aux USA.

- ii) **Antigène *Mycoplasma synoviae***

Des antigènes préparés à partir de la souche WVU1853 ou d'autres souches convenables peuvent être utilisés.

Antigènes *Mycoplasma synoviae* pour l'ARL : les spécifications décrites pour les antigènes MG pour ARL s'appliquent.

Antigène *Mycoplasma synoviae* pour épreuves d'IHA : les spécifications décrites pour les antigènes pour IHA MG s'appliquent.

iii) Autres commentaires

Les sérums donnant des réactions non spécifiques en ARL ne donnent pas, en règle générale, de réaction positive lors d'épreuve d'IHA, si on utilise un antigène hémagglutinant frais. Des réactions positives en ARL peuvent être confirmées par une épreuve d'IHA avec des sérums prélevés après les 2 à 3 premières semaines d'infection (le temps nécessaire au développement des anticorps inhibant l'hémagglutination). Cependant l'épreuve d'IHA tend à être spécifique de souche (20) et peut donc manquer de spécificité. L'ELISA peut être une alternative intéressante.

Les échantillons de sérums ne doivent pas être congelés avant utilisation pour l'ARL. Ils ne doivent pas être hémolysés ni contaminés pour éviter les réactions non spécifiques. L'utilisation de vaccins inactivés pour d'autres maladies peut donner des réactions non spécifiques. Les échantillons doivent être testés aussi vite que possible (dans les 72 h) parce que les anticorps anti-mycoplasmiques peuvent se dégrader lors du stockage. Les sérums peuvent être inactivés par chauffage dans un bain-marie à 56°C pendant 30 min.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

La meilleure méthode de contrôle est le maintien de troupeaux indemnes de MG et de MS. La vaccination ne doit être envisagée que dans les situations dans lesquelles l'exposition est inévitable comme dans des sites multi-âges. Le risque d'exposition des troupeaux de volailles voisins doit aussi être soigneusement considéré.

Deux types de vaccins sont disponibles pour le contrôle de MG. Il peut s'agir de vaccins vivants atténués ou avirulents ou de vaccins inactivés sous forme d'émulsion huileuse. Le sujet de la vaccination par MG a été revu par Whihear (35). Bien qu'il y ait des variations antigéniques entre les souches de MG, il est admis que la vaccination avec une seule souche est suffisante.

Les lignes directrices pour la production de vaccins vétérinaires sont données dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont d'ordre général et peuvent être complétées par des exigences nationales ou régionales.

• Vaccins vivants : méthode d'utilisation

L'utilisation de vaccins vivants est l'équivalent d'une « exposition contrôlée ». L'objectif est d'infecter le troupeau avec une souche peu pathogène et immunogène à un âge auquel les conséquences seront faibles ou non significatives. Une telle exposition provoque un futur état de résistance au cours de la vie des oiseaux comme dans le cas de sites de production multi-âges. Les oiseaux correctement vaccinés sont résistants à la maladie respiratoire, aux aérosacculites et à la chute de ponte causées par MG. La vaccination permet aussi de réduire le niveau de transmission verticale chez les reproducteurs.

La souche MG F a été la souche vaccinale la plus utilisée (5). C'est une souche naturelle de virulence faible à modérée pour le poulet mais virulente pour la dinde. Ordinairement, elle diffuse lentement d'oiseau à oiseau. L'administration à des poulets en bonne santé par voie respiratoire haute ne provoque que peu ou pas de symptôme respiratoire. Cependant lors d'administration par aérosol ou en présence d'autres agents responsables de maladies respiratoires, tels que les virus de la maladie de Newcastle ou de la bronchite infectieuse aviaire, des signes respiratoires ou des aérosacculites peuvent survenir. Les oiseaux vaccinés sont des porteurs chroniques et une seule dose suffit. L'utilisation de la souche vaccinale F dans chaque nouveau lot dans un site multi-âge va finalement provoquer le remplacement de la souche sauvage par la souche vaccinale. Les souches ts-11 et 6/85 ne sont pas virulentes et ne diffusent pas vers les oiseaux non vaccinés, sauf éventuellement de façon limitée vers des oiseaux en contact étroit (25).

Les poulettes commerciales sont vaccinées en règle générale entre 12 et 16 semaines mais la vaccination d'oiseaux plus jeunes ou plus âgés est permise. Il est essentiel de vacciner avant que le lot ne soit infecté naturellement. En cas de risque d'infection pour des jeunes, il est possible de vacciner dès 2 à 4 semaines. Pour la souche F une vaccination par voie intranasale ou par instillation oculaire est préférable. En cas d'administration par l'eau de boisson, certains oiseaux risquent de ne pas être vaccinés, si la procédure d'administration n'est pas rigoureuse. L'administration par nébulisation doit également être effectuée avec soin, de façon à ce que tous les oiseaux soient exposés. Une réaction respiratoire peut être attendue environ 5 à 7 jours après vaccination par

aérosol. Les lots vaccinés doivent être contrôlés par agglutination rapide sur lame environ 3 à 4 semaines après la vaccination pour s'assurer que tous les oiseaux ont été correctement infectés. Il est souhaitable de vacciner les oiseaux à un âge auquel il n'y a pas de réaction vis-à-vis des autres vaccins respiratoires. La souche ts-11 doit être administrée par instillation oculaire et la souche 6/85 par fin aérosol. La vaccination avec la souche ts-11 provoque une réaction sérologique faible, mais significative observée par agglutination rapide sur lame, IHA ou ELISA alors que la souche 6/85 n'induit pas de réponse sérologique. Aucune réaction vaccinale ne doit être observée avec les souches 6/85 ou ts-11. Les lots vaccinés avec la souche F ou la souche ts-11 sont positifs en culture pendant toute leur vie alors que la souche 6/85 peut être difficile à réisoler après plus de 4-6 semaines après vaccination.

Les vaccins commerciaux vivants doivent être utilisés dans les 1 à 2 h qui suivent la reconstitution. Les vaccins lyophilisés doivent être conservés à 4 °C. Certains fabricants fournissent un vaccin congelé. Ces vaccins doivent être conservés dans l'azote liquide ou la neige carbonique, à -70 °C ou à une température inférieure. Les vaccins MG vivants ne sont pas stables pendant de longues périodes dans un réfrigérateur ordinaire. Un stockage de plus de quelques jours à -20 °C doit être évité.

L'innocuité des souches 6/85 et ts-11 est meilleure que celle de la souche F mais leur niveau de protection est plutôt inférieur ; elles peuvent être utilisées soit comme première vaccination dans un site multi-âges soit comme deuxième génération de vaccin sur un site précédemment vacciné avec la souche F. Elles peuvent également être préférées dans les cas de risque d'exposition accidentelle de troupeaux avoisinants. La souche F « déplace » les souches sauvages de MG plus efficacement que les souches ts-11 ou 6/85, mais la souche ts-11 a été utilisée pour éradiquer la souche F de site de ponte d'âges multiples (33). Dans les sites multi-âges où la souche 6/85 est couramment utilisée, les réactions sérologiques vis-à-vis de MG sont souvent négatives suggérant que la souche sauvage a été remplacée.

Les vaccins vivants ont également été utilisés dans certains pays pour vacciner les poulettes reproductrices de type chair. En Australie, le vaccin ts-11 est largement utilisé pour la vaccination des poulettes futures reproductrices type chair comme pour celle des poules pondeuses. La souche vaccinale F a été utilisée pour les poulettes futures reproductrices type chair élevées sur des sites d'âges multiples dans certains pays d'Amérique Latine pendant plusieurs années ; plus récemment les souches 6/85 et ts-11 ont été employées de façon limitée. Selon ce qui est rapporté et l'expérience personnelle concernant les performances des reproducteurs et les troubles respiratoires de leurs progénitures, il semble que ces vaccins aient été utiles et efficaces lorsqu'ils étaient bien administrés. La souche vaccinale 6/85 a été employée de façon limitée comme vaccin pour les dindes de production aux États-Unis d'Amérique mais il n'y a pas de données satisfaisantes sur son efficacité. En règle générale, la vaccination des dindes avec des vaccins vivants n'est pas recommandée et la vaccination des poulets de chair avec soit des vaccins vivants soit des vaccins inactivés n'est pas efficace. Aucun vaccin n'a été validé pour l'usage pour les oiseaux sauvages.

Un vaccin vivant contre l'infection par MS est disponible dans certains pays pour usage sur les poulets de chair et les poules pondeuses. Il est produit à partir d'un mutant froid, MS-H (29). Ses caractéristiques et ses modalités d'utilisation sont semblables à celles du vaccin ts-11 contre l'infection par MG.

- **Vaccins inactivés : méthode d'utilisation**

Les bactérines MG sont préparées à partir de suspensions concentrées de cellules entières qui sont émulsifiées avec un adjuvant huileux. Une forte concentration antigénique est indispensable.

Les bactérines sont généralement utilisées chez les poulettes commerciales pour les protéger des chutes de ponte qui surviennent dans les sites d'âges multiples (13). Elles peuvent également être utilisées chez les futures reproductrices pour réduire le niveau de transmission verticale. L'utilisation des bactérines chez le poulet de chair est limitée par le fait que les oiseaux vaccinés avant 1 à 2 semaines d'âge ne sont pas protégés. Bien que les bactérines puissent protéger vis-à-vis des signes respiratoires, de l'aérosacculite et des chutes de ponte, les lots vaccinés demeurent infectés. La durée de l'immunité n'est pas connue, mais la plupart des lots sont exposés 1 à 2 mois après vaccination.

L'administration se fait par voie intramusculaire ou sous-cutanée, avec en général une dose de 0,5 ml par oiseau. La vaccination par voie intramusculaire risque d'entraîner une réaction persistante au lieu d'injection ce qui nécessitera un parement de la carcasse ; aussi une administration par voie sous-cutanée dans le haut de la partie dorsale du cou est la voie la plus utilisée. Deux doses sont préférables mais des considérations de coût et de main d'œuvre peuvent dicter la réalisation d'une seule administration, en règle générale vers 16 à 18 semaines pour des poulettes commerciales. Une seringue multi-dose peut être employée. Tous les matériels doivent être nettoyés et stérilisés entre chaque lot et les équipes de vaccination doivent respecter les mesures de biosécurité quand elles opèrent sur plusieurs lots. Le vaccin doit être conservé à 2-8 °C jusqu'à utilisation. Il ne doit pas être congelé ni être exposé à une forte lumière.

Une bactérine semblable a obtenu l'autorisation de mise sur le marché aux États-Unis, mais son utilisation reste limitée.

1. Gestion des semences bactériennes

a) Caractéristiques de la semence bactérienne

- **Vaccins vivants**

La souche vaccinale doit être immunogène, doit coloniser facilement l'appareil respiratoire supérieur et causer un minimum de lésions de l'appareil respiratoire. Une forte réponse en anticorps n'est pas forcément corrélée avec l'immunité.

La semence primaire doit être indemne de tout autre agent. La culture doit être clonée pour s'assurer de sa pureté. Si nécessaire les profils de restriction de l'ADN mycoplasmaïque doivent être analysés par électrophorèse sur gel d'agarose pour s'assurer de l'identité et de la pureté de la souche.

La culture primaire doit être stable et ne pas avoir tendance à recouvrer sa virulence. Ceci peut être confirmé par 10 passages successifs sur poulets sensibles. Des poulets « contacts » peuvent être introduits chaque semaine. Si nécessaire des écouvillonnages peuvent être réalisés sur les oiseaux infectés, puis les écouvillons sont insérés dans la trachée des poulets « contacts ». La transmission du micro-organisme doit être prouvée. L'isolat ainsi obtenu peut ensuite être utilisé pour tester des poulets sensibles.

- **Vaccins inactivés**

Pour les vaccins inactivés, les caractéristiques les plus importantes sont un bon rendement et un fort pouvoir antigénique. Il est supposé mais non prouvé que les souches virulentes sont préférables. La semence primaire doit être indemne de tout autre micro-organisme.

b) Méthode de culture

La culture primaire peut être ensemencée dans un milieu semblable à celui décrit plus haut (section B.1). Pour les vaccins vivants, le milieu de culture est lyophilisé ou surgelé à une température inférieure ou égale à -70 °C. Pour les bactérines, la culture doit être concentrée et resuspendue dans un petit volume de solution saline ou de PBS avant la préparation de l'émulsion.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Des données d'efficacité doivent être obtenues avant de lancer la préparation de vaccins en fermenteur. Des poulets doivent être vaccinés selon la voie qui sera utilisée sur le terrain. Les oiseaux vaccinés doivent être testés et le niveau de protection vis-à-vis des symptômes respiratoires, d'un écoulement nasal et ou de l'aérosacculite doit être déterminé. Dans l'absolu, il faudrait également évaluer la protection vis-à-vis des pertes de production d'œufs mais de tels essais sont coûteux et lourds.

Test d'efficacité : des groupes de 20 poulets exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) ou au moins indemnes de mycoplasmes, âgés d'au moins 2 semaines, sont vaccinés par instillation oculaire ou une autre voie d'administration avec une dose d'un vaccin vivant ou par voie sous-cutanée ou intramusculaire avec une dose (en général 0,5 ml) de bactérines. Un groupe identique de poulets non vaccinés est maintenu séparément et sert de témoin. Tous les poulets doivent être testés avec une culture de 24 h d'une souche virulente de MG, 2 à 3 semaines après vaccination. Une méthode d'épreuve simple consiste à inoculer 0,1 ml de la culture d'épreuve dans le sac aérien thoracique postérieur. Tous les oiseaux sont autopsiés 7 à 10 jours après épreuve et les lésions des sacs aériens sont notées. Une méthode alternative consiste à inoculer 0,1 ml dans le sinus infra-orbitaire et à examiner les oiseaux pour rechercher un écoulement nasal 7 à 14 jours après épreuve ou à tester par aérosol et mesurer l'épaisseur de la muqueuse trachéale sur des coupes microscopiques en 4 ou 6 points équidistants prédéterminés (35).

2. Méthode de fabrication

Le vaccin doit être préparé dans des locaux appropriés, propres et sécurisés, bien séparés des locaux réservés au diagnostic ou aux volailles commerciales. Une attention particulière doit être portée pour éviter la contamination par MG des autres produits préparés dans les mêmes locaux.

La production vaccinale doit être faite par lot de semence, en utilisant une souche convenable de MG, d'origine, de nombre de passages, et de pureté connus. Le milieu de culture est comparable à celui décrit plus haut. Le sérum utilisé pour le milieu de culture doit être inactivé par chauffage à 56 °C pendant 1 h pour éviter les

contaminations par d'autres mycoplasmes éventuellement présents, puis stérilisé par filtration. Un sérum issu d'animaux EOPS est recommandé.

Le milieu de culture est inoculé avec un inoculum à croissance rapide, à un niveau d'environ 5 % (v/v). L'incubation est conduite à 37 °C. La production peut être faite en lots en utilisant de larges flacons ou dans un fermenteur. Lors de la production, la récolte est réalisée environ 24 h après inoculation. Les vaccins vivants sont conservés par lyophilisation ou surgélation à –70 °C, dans l'azote liquide ou la neige carbonique.

Pour la production de bactérines, l'antigène doit être concentré, en général par centrifugation ultrafiltration ou tout autre méthode convenable. Les bactérines sont préparées sous forme d'émulsion eau-dans-huile, généralement 80 % d'huile minérale et 20 % d'eau avec des agents émulsifiants appropriés.

3. Contrôles en cours de fabrication

Contenu antigénique : lors de la récolte, le titre devrait être entre 10^8 et 10^9 UFC/ml. La concentration antigénique des bactérines est difficile à normaliser mais peut être basée sur le volume des cellules après centrifugation qui est typiquement de 1 % (v/v) de cellules après centrifugation dans le produit final.

Inactivation des vaccins tués : l'inactivation est souvent faite à l'aide de bêta-propiolactone ou du formol. L'agent d'inactivation et la procédure d'inactivation doivent avoir montré, dans les conditions de préparation du vaccin, leur capacité à inactiver la souche vaccinale et de potentiels contaminants.

Avant inactivation, l'attention doit être portée à l'obtention d'une suspension homogène, sans particules qui risquent de ne pas être pénétrées par l'agent d'inactivation. Un test d'inactivation doit être conduit par mise en culture dans un milieu pour mycoplasmes de chaque lot récolté après inactivation, et du produit final. Il ne doit être observé aucune culture de mycoplasmes.

Stérilité des vaccins tués : l'huile utilisée pour le vaccin doit être stérilisée par chauffage à 160 °C pendant 1 h, ou par filtration, et la preuve de l'efficacité du procédé doit être démontrée. Les tests appropriés aux vaccins huileux sont effectués sur chaque lot de produit final, comme décrit par exemple dans la Pharmacopée britannique (Vétérinaire) 1985.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests de contrôle de stérilité et d'absence de contaminants biologiques peuvent être trouvés dans le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

- **Test d'innocuité pour les vaccins vivants**

Les oiseaux utilisés dans le test d'efficacité décrit plus haut peuvent être utilisés pour évaluer l'innocuité du vaccin.

- **Test d'innocuité des vaccins inactivés**

Les oiseaux utilisés dans le test d'efficacité décrit plus haut doivent faire l'objet d'une observation pour la mise en évidence de réactions locales ou générales.

c) Activité

Les tests d'activité des vaccins vivants ou inactivés peuvent être conduits selon les procédures décrites plus haut pour les tests d'efficacité. Le titre des vaccins vivants doit être suffisant pour induire une infection selon la voie d'administration recommandée ; 10^5 UFC par dose est suffisant pour une administration par voie oculaire pour la souche vaccinale F. La dose recommandée pour la souche vaccinale ts-11 est supérieure à $10^{7,7}$ unités changeant la couleur (UCC)/dose et pour la souche 6/85 une dose de 10^7 à 10^8 UFC était efficace lors des expérimentations. Pour la souche MS-H, des doses supérieures ou égales à $4,8 \times 10^5$ se sont révélées efficaces.

d) Durée de l'immunité (vaccins inactivés)

Les volailles étant généralement exposées dans les 1 à 2 mois après vaccination, la durée de l'immunité n'est pas une considération primordiale. Après une exposition naturelle, la résistance est considérée permanente.

e) Stabilité

Il doit être prouvé sur 3 lots de vaccin que le vaccin satisfait au test d'activité 3 mois après la date limite d'utilisation.

f) Agents de conservation

Un agent de conservation est généralement nécessaire dans les flacons multidoses. La concentration de l'agent de conservation dans le vaccin final et sa persistance jusqu'à la date limite d'utilisation doivent être contrôlées.

Un agent de conservation convenable qui a déjà été évalué dans des circonstances identiques doit être utilisé. Les mycoplasmes sont sensibles à de nombreux antimicrobiens à l'exception des pénicillines ; ces antibiotiques ne doivent pas être utilisés comme agents de conservation.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Les vaccins sous forme d'émulsions huileuses provoquent des blessures graves lors d'injections accidentelles dans la main ou d'autres tissus. En cas d'un tel accident, la personne doit se rendre immédiatement à l'hôpital, en emportant l'emballage du flacon de vaccin avec elle. Chaque flacon de vaccin et chaque emballage doivent comporter une indication claire mettant en garde contre les conséquences graves d'auto-injection accidentelle. De telles blessures doivent être traitées par le médecin urgentiste comme des blessures par arme à feu.

Les personnes vaccinant des oiseaux par nébulisation avec des vaccins à virus vivants doivent porter des vêtements protecteurs et des masques.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir section C.4.b.

b) Activité

Voir section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALLAN W.H. & GOUGH R.E. (1974). A standard haemagglutination test for Newcastle disease. 1. A comparison of macro and micro methods. *Vet. Rec.*, **95**, 120–123.
2. ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE (APHIS), USDA (2004). National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provisions. APHIS Publication 91-55-063. APHIS, USDA, Riverdale, Maryland, USA, 97–100.
3. BRADBURY J.M. (2001). Avian mycoplasmas. *In*: Poultry Diseases, Fifth Edition, Jordan F., Pattison M., Alexander D. & Faragher T., eds. W.B. Saunders, London, UK, 178–193.
4. BRADBURY J.M. (2005). Workshop of European Mycoplasma Specialists. *World Poult. Sci. J.*, **61**, 355–357.
5. CARPENTER T.E., MALLINSON E.T., MILLER K.F., GENTRY R.F. & SCHWARTZ L.D. (1981). Vaccination with F-strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. *Avian Dis.*, **25**, 404–409.
6. CLYDE W.A., JR. (1983). Growth inhibition tests. *In*: Methods in Mycoplasmaology, Vol. 1, Razin S. & Tully J.G., eds. Academic Press, New York, USA, and London, UK, 405–410.
7. CZIFRA G., SUNDQUIST B., TUBOLY T. & STIPKOVITS L. (1993). Evaluation of a monoclonal blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum*-specific antibodies. *Avian Dis.*, **37**, 680–688.
8. FAN H.H., KLEVEN S.H. & JACKWOOD M.W. (1995). Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, **39**, 729–735.

9. FERGUSON N.M., HEPP D., SUN S., IKUTA N., LEVISOHN S., KLEVEN S.H. & GARCÍA M. (2005). Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies *Microbiol.*, **151**, 1883–1893.
10. FREUNDT E.A. (1983). Culture media for classic mycoplasmas. *In*: The Mycoplasmas, Vol. 1, Razin S. & Tully J.G., eds. Academic Press, New York, USA and London, UK, 127–135.
11. FREY M.L., HANSON R.P. & ANDERSON D.P. (1968). A medium for the isolation of avian Mycoplasmas. *Am. J. Vet. Res.*, **29**, 2163–2171.
12. GARCÍA M., IKUTA N., LEVISOHN S. & KLEVEN S.H. (2005). Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis.*, **49**, 125–132.
13. HILDEBRAND D.G., PAGE D.E. & BERG J.R. (1983). *Mycoplasma gallisepticum* (MG) — laboratory and field studies evaluating the safety and efficacy of an inactivated MG bacterin. *Avian Dis.*, **27**, 792–802.
14. HONG Y., GARCÍA M., LEITING L., BENCINA D., DUFOUR-ZAVALA L., ZAVALA G. & KLEVEN S.H. (2004). Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene vlhA. *Avian Dis.*, **48**, 606–616.
15. HONG Y., GARCIA M., LEVISOHN S., SAVELKOUL P., LEITING V., LYSNYANSKY I., LEY D.H. & KLEVEN S.H. (2005). Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using amplified fragment length polymorphism and other DNA-based typing methods. *Avian Dis.*, **49**, 43–49.
16. KEMPF I. (1998). DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Avian Pathol.*, **27**, 7–14.
17. KLEVEN S.H. (2003). *Mycoplasma synoviae* infection. *In*: Diseases of Poultry, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 756–766.
18. KLEVEN S.H., FLETCHER O.J. & DAVIS R.B. (1973). Variation of pathogenicity of isolates of *Mycoplasma synoviae* with respect to development of airsacculitis and synovitis in broilers. *Am. J. Vet. Res.*, **163**, 1196–1196.
19. KLEVEN S.H., KING D.D. & ANDERSON D.P. (1972). Airsacculitis in broilers from *Mycoplasma synoviae*: effect on air-sac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus. *Avian Dis.*, **16**, 915–924.
20. KLEVEN S.H., MORROW C.J. & WHITHEAR K.G. (1988). Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. *Avian Dis.*, **32**, 731–741.
21. KOTANI H. & MCGARRITY G.J. (1985). Rapid and simple identification of Mycoplasmas by immunobinding. *J. Immunol. Methods*, **85**, 257–267.
22. LANDMAN W.J.M. & FEBERWEE A. (2004). Aerosol-induced *Mycoplasma synoviae* arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection. *Avian Pathol.*, **33**, 591–598.
23. LAUERMAN L.H. (1998). Mycoplasma PCR Assays. *In*: Nucleic Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases, Lauerman L.H., ed. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Auburn, AL, USA, 41–52.
24. LEY D.H. (2003). *Mycoplasma gallisepticum* infection. *In*: Diseases of Poultry, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 722–744.
25. LEY D.H., MCLAREN J.M., MILES A.M., BARNES H.J., MILLER S.H. & FRANZ G. (1997). Transmissibility of live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from vaccinated layer pullets to sentinel poultry. *Avian Dis.*, **41**, 187–194.
26. LOCKABY S.B., HOERR F.J., LAUERMAN L.H., SMITH B.F., SAMOYLOV A.M., TOIVIO-KINNUNAN M.A. & KLEVEN S.H. (1999). Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.*, **43**, 251–261.

27. LUTTRELL M.P., FISCHER J.R., STALLKNECHT D.E. & KLEVEN S.H. (1996). Field investigation of *Mycoplasma gallisepticum* infections in house finches (*Carpodacus mexicanus*) from Maryland and Georgia. *Avian Dis.*, **40**, 335–341.
28. MALLINSON E.T., ECKROADE R.J. & KLEVEN S.H. (1981). *In vivo* bioassay and supplemental serologic techniques for the detection of *Mycoplasma* in suspect breeding chickens. *Avian Dis.*, **25**, 1077–1082.
29. MARKHAM J.F., MORROW C.J. & WHITHEAR K.G. (1998). Efficacy of a temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* live vaccine. *Avian Dis.*, **42**, 671–676.
30. MAROIS C., DUFOUR-GESBERT F. & KEMPF I. (2002). Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in environmental samples. *Avian Pathol.*, **31**, 163–168.
31. ROSENDAL S. & BLACK F.T. (1972). Direct and indirect immunofluorescence of unfixed and fixed mycoplasma colonies. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B]*, **80**, 615–622.
32. TALKINGTON F.D. & KLEVEN S.H. (1983). A classification of laboratory strains of avian *Mycoplasma* serotypes by direct immunofluorescence. *Avian Dis.*, **27**, 422–429.
33. TURNER K.S. & KLEVEN S.H. (1998). Eradication of live F strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccine using live ts-11 on a multiage commercial layer farm. *Avian Dis.*, **42**, 404–407.
34. WANG H., FADL A.A. & KHAN M.I. (1997). Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. *Molec. Cell. Probes*, **11**, 211–216.
35. WHITHEAR K.G. (1996). Control of avian mycoplasmoses by vaccination. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15**, 1527–1553.
36. ZAIN M.Z. & BRADBURY J.M. (1996). Optimising the conditions for isolation of *Mycoplasma gallisepticum* collected on applicator swabs. *Vet. Microbiol.*, **49**, 45–57.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la mycoplasmoses aviaires (*Mycoplasma gallisepticum* et *M. synoviae*) (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

TUBERCULOSE AVIAIRE

RÉSUMÉ

La tuberculose aviaire est une maladie importante des oiseaux qu'il s'agisse d'oiseaux de compagnie, exotiques en captivité, domestiques ou sauvages. Elle est le plus souvent causée par Mycobacterium avium (sérotypes 1, 2 et 3) et M. genavense. M. avium est la principale cause de maladies des volailles.

Les signes cliniques de la maladie dépendent des organes affectés. La forme chronique est la plus fréquente et est caractérisée par une faiblesse et un amaigrissement progressif chronique. La diarrhée est fréquente. Quelques oiseaux peuvent présenter des signes respiratoires et parfois la mort peut survenir brutalement. Certains oiseaux peuvent développer des lésions oculaires granulomateuses.

Mycobacterium tuberculosis est moins fréquemment la cause d'une infection chez l'oiseau, et quand une telle infection survient, elle est souvent la conséquence d'une contamination à partir du propriétaire ; les symptômes sont différents de ceux observés lors d'infections par d'autres espèces de mycobactéries.

Le complexe Mycobacterium avium et M. intracellulare peuvent aussi infecter de nombreuses espèces animales différentes comme le porc, les bovins, les cervidés, les moutons, les chèvres, les chevaux, les chats, les chiens et des espèces exotiques. Mycobacterium genavense a aussi été signalée chez un chien et un chat immunodéprimé. L'apparition de la maladie chez l'oiseau est en général plus rapide avec Mycobacterium genavense qu'avec M. avium.

Chez l'homme, M. avium et Mycobacterium genavense sont capables d'induire une maladie progressive réfractaire à tout traitement, notamment chez les patients immunodéprimés. Toutes les opérations impliquant la manipulation de cultures vivantes ouvertes ou de matériels provenant d'oiseaux infectés doivent être exécutées sous une hotte de sécurité adéquate.

Le diagnostic de la tuberculose chez les oiseaux dépend de la mise en évidence de Mycobacterium spp. chez les oiseaux morts, ou la détection d'une réponse immunitaire, cellulaire ou humorale, chez les oiseaux vivants.

Identification de l'agent pathogène : *soit les signes cliniques sont observés dans un troupeau, soit des lésions typiques de tuberculose sont présentes chez les oiseaux à l'autopsie ; la mise en évidence de bacilles acido-alcool-résistants sur des frottis ou des coupes faites à partir d'organes affectés est alors suffisante pour un diagnostic positif. Si des bacilles acido-alcool-résistants ne sont pas trouvés, mais des signes ou des lésions typiques sont présents chez les oiseaux, la culture de l'organisme doit être entreprise. Les organismes acido-alcool-résistants isolés doivent être identifiés sur des critères biochimiques, sérologiques, chromatographiques (chromatographie liquide à haute performance [HPLC pour high performance liquid chromatography]) ou par des tests basés sur la détection des acides nucléiques.*

Test tuberculinique et épreuves sérologiques : *ces tests sont normalement utilisés pour déterminer la prévalence de la maladie dans un troupeau, ou pour détecter les oiseaux infectés. Quand ils sont utilisés pour détecter la présence de la tuberculose dans un troupeau, ils seront renforcés par l'autopsie des oiseaux qui donnaient des réactions positives.*

Chez les volailles domestiques, le test tuberculinique dans les barbillons a été le test de choix. Ce test est moins utilisé chez les autres espèces d'oiseaux. Un meilleur test, surtout pour les oiseaux aquatiques, est l'épreuve d'agglutination du sang total avec un antigène coloré (Rozanska). Il est

plus fiable et a l'avantage de donner un résultat en quelques minutes, alors que l'oiseau est encore maintenu. Les tests ne sont pas fiables pour les oiseaux en cage.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : aucun vaccin n'est disponible pour utilisation chez les oiseaux. Une préparation antigénique coloré avec du vert malachite à 1 % est disponible pour l'épreuve d'agglutination du sang total. La tuberculine aviaire PPD (Purified Protein Derivative) est la préparation de référence pour l'emploi dans le test tuberculinique des volailles domestiques.

A. INTRODUCTION

Plusieurs espèces de mycobactéries peuvent être impliquées dans l'étiologie de la tuberculose aviaire. Le complexe *Mycobacterium avium* (sérotypes 1, 2 et 3) et *M. genavense* en sont les causes les plus fréquentes (25). D'autres espèces, telles que *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. tuberculosis* et *M. bovis* sont moins fréquemment impliquées dans la tuberculose aviaire (25). Le complexe *M. avium* et *M. intracellulare* sont capables d'infecter une large gamme d'espèces animales différentes comme les porcs, les bovins, les cervidés, les moutons, les chèvres, les chevaux les chats, les chiens et des espèces exotiques (26, 27).

Le complexe *M. avium* comprend 3 sous-espèces : *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *sylvaticum* et *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (28). Cette dernière est l'agent causal de la maladie de Johne, ou paratuberculose, chez les ruminants et d'autres espèces de mammifères (voir chapitre 2.1.11., « Paratuberculose »). Bien que des infections expérimentales avec *M. a. paratuberculosis* aient été réalisées avec succès chez les volailles (11), rien ne prouve que ce micro-organisme soit impliqué dans l'étiologie de la tuberculose aviaire.

La plupart des isolats de *M. a. avium* à partir d'oiseaux présentent une séquence répétitive IS901 dans leur génome et donnent un profil caractéristique à trois bandes lors d'analyse du polymorphisme de longueur des fragments après digestion par des enzymes de restriction (RFLP pour *restriction fragment length polymorphism*) (20). Des arguments existent pour associer la présence de IS901 au pouvoir pathogène chez les oiseaux (6, 15). Cette séquence répétitive est aussi présente chez *M. a. sylvaticum* qui est capable d'entraîner la tuberculose chez les oiseaux. IS901 n'a été retrouvée que dans les souches de *M. avium*, sérotypes 1, 2 et 3 (15, 20), qui sont plus pathogènes pour les oiseaux que les autres sérotypes (25). Sur la base de différences génétiques et phénotypiques, il a été proposé récemment de diviser *M. a. avium* en deux sous-espèces : *M. a. hominissuis* pour les isolats d'origine humaine ou porcine et *M. a. avium* pour les isolats d'origine aviaire (13). Les isolats dénommés *M. a. hominissuis* présentent un profil IS1245 multi-bandes et sont capables de cultiver à 24 °C et à 45 °C. En revanche, les isolats d'origine aviaire dénommés *M. a. avium* présentent le profil à 3 bandes dans l'analyse RFLP IS1245, et sont incapables de cultiver à 24 °C et 45 °C (13). Il convient de remarquer que les caractéristiques des isolats aviaires, à savoir le profil à 3 bandes dans l'analyse RFLP IS1245 et la présence IS901, ont été retrouvées chez les souches de *M. a. avium* isolées de cervidés et de bovins (14).

La tuberculose chez les oiseaux est plutôt répandue chez les poulets et chez les oiseaux sauvages élevés en captivité. Les dindes sont très sensibles, mais les canards et les oies sont relativement résistants. Les habitudes consistant à laisser les volailles errer en liberté dans la ferme et à garder les reproducteurs pendant plusieurs années, favorisent la propagation de la tuberculose parmi eux. Les individus infectés et le milieu extérieur (sol et eau) contaminé sont les principales sources de contamination (25). Les mycobactéries peuvent survivre plusieurs mois dans le milieu extérieur (25).

Dans la plupart des cas, les oiseaux infectés ne présentent pas de signes cliniques, mais ils peuvent éventuellement devenir léthargiques et émaciés. La diarrhée est fréquente chez beaucoup d'animaux infectés ainsi qu'une régression et une pâleur de la crête ou de la caroncule. En général, les oiseaux affectés sont âgés de plus d'un an. Certains oiseaux présentent des signes respiratoires et la mort peut survenir brutalement ; la dyspnée est moins fréquente ; des lésions granulomateuses oculaires (16) et des lésions cutanées ont été signalées. Dans les conditions d'élevage intensif, des morts soudaines peuvent se produire, souvent associées à des lésions sévères du foie ; de telles lésions sont facilement observées à l'examen post-mortem (25).

Les lésions primaires de la tuberculose chez les oiseaux sont presque toujours dans le tractus digestif. De telles lésions prennent la forme d'ulcères profonds remplis d'un matériel caséeux contenant beaucoup d'organismes, qui sont éliminés dans la lumière de l'intestin et qui apparaissent dans les fèces. Avant que le tractus digestif ne soit ouvert, les aires ulcérées apparaissent comme des masses ressemblant à des tumeurs attachées à la paroi de l'intestin, mais quand l'intestin est ouvert la vraie nature de la masse devient évidente. Les lésions caséeuses typiques sont presque toujours retrouvées dans le foie et la rate, et ces organes sont d'habitude très hypertrophiés en raison de la formation d'un nouveau tissu tuberculeux. Les poumons et les autres tissus sont ordinairement sans lésion même dans les cas avancés.

Chez la plupart des espèces d'oiseaux, les lésions tuberculeuses sont surtout retrouvées dans le tractus intestinal, le foie et la rate. Dans les autres organes, les lésions sont moins fréquentes. Des exceptions existent et chez certains oiseaux comme les pigeons, le gibier d'eau et quelques pinsons, la maladie commence en premier lieu au niveau de l'appareil respiratoire.

Il est essentiel de garder à l'esprit que *M. avium*, *M. intracellulare* et *M. genavense* sont capables de donner naissance chez l'homme à une maladie progressive réfractaire au traitement, surtout chez les individus immunodéprimés (25). Toutes les manipulations impliquant la manipulation de culture ouvertes vivantes ou de matériels provenant d'oiseaux infectés doivent être réalisées sous une hotte de sécurité adéquate (Voir Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries »).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

S'il existe une histoire caractéristique de tuberculose dans un troupeau et que des lésions typiques sont retrouvées chez les oiseaux à l'autopsie, la détection des bacilles acido-alcool-résistants dans les frottis ou les sections d'organes infectés, colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen, est normalement suffisante pour établir le diagnostic. Occasionnellement, un cas peut apparaître, probablement conséquence d'une dose infectante importante donnant naissance à une maladie aiguë accablante, dans laquelle les organes affectés, le plus souvent le foie, ont une apparence de « cuir marocain » avec de fines taches verdâtres et jaunâtres. Dans de tels cas, des organismes acido-alcool-résistants peuvent ne pas être trouvés, mais une inspection soigneuse révélera des faisceaux parallèles de bacilles réfringents brunâtres. La prolongation de l'étape de chauffage de la fuchsine dans la coloration de Ziehl-Neelsen à 10 min révèle habituellement qu'il s'agit vraiment de bacilles acido-alcool-résistants, avec exceptionnellement une haute résistance à la pénétration du colorant. Récemment, les techniques utilisant les sondes ADN et l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été utilisées pour identifier l'agent. Traditionnellement, *M. avium* se distingue des organismes communs non chromogènes à croissance lente par leur capacité à pousser à 42 °C (*M. a. avium*) et par des tests biochimiques tels que l'hydrolyse du Tween, la pyrazinamidase, la culture sur milieu contenant l'hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique (TCH) et la réduction du tellurite. La croissance de *Mycobactérium genavense* est particulièrement lente et réclame des conditions particulière pour la culture et l'identification.

• Culture

S'il existe une histoire caractéristique au sein du troupeau et que des lésions suggestives sont retrouvées à l'autopsie, mais qu'aucun bacille acido-alcool-résistant n'est observé dans les frottis ou coupes, un essai doit être fait pour isoler l'agent causal à partir du matériel d'autopsie. Le foie ou la rate sont habituellement les meilleurs organes à utiliser, mais si la carcasse est décomposée, la moelle osseuse peut s'avérer plus satisfaisante puisqu'elle pourrait être moins contaminée. Comme pour l'isolement de *M. bovis*, les échantillons prélevés de manière non stérile doivent être traités avec un détergent, de la soude ou de l'acide afin d'éliminer les micro-organismes à croissance rapide (voir Chapitre 2.4.7., « Tuberculose bovine »). *Mycobacterium avium* pousse mieux sur les milieux tels que le milieu de Lowenstein-Jensen, le milieu de Herrold, les milieux de Middlebrook 7H10 et 7H11 ou le milieu de Coletos additionnés de 1 % de pyruvate de sodium. Il peut occasionnellement être nécessaire d'incorporer de la mycobactine, comme c'est le cas pour l'isolement de *M. paratuberculosis* et *M. silvaticum*. La croissance peut être limitée à la lisière de l'eau de condensation. Les cultures doivent être incubées pendant au moins 8 semaines. Habituellement *M. avium* produit des colonies lisses en 2 à 4 semaines, mais des variants rugueux se produisent. Des durées d'incubation plus courtes peuvent être obtenues en utilisant le système BACTEC de culture liquide.

Pour la culture de *M. genavense*, l'utilisation du système BACTEC sans additif est recommandé mais à pH 6 et avec une pression d'oxygène plus faible (18, 19). Le meilleur milieu solide est le milieu Middlebrook 7H11 supplémenté avec du sang et du charbon et à pH 6 (17).

Le typage des mycobactéries au niveau de l'espèce et de la sous-espèce exige un laboratoire spécialisé. Les tests biochimiques conventionnels pour l'identification des espèces sont longs et ne font pas la distinction entre *M. avium* et *M. intracellulare*. Ainsi, un groupe de diverses mycobactéries incluant les deux espèces, est-il habituellement classé sous la dénomination de complexe *M. avium* (MAC). La séroagglutination, qui repose sur la spécificité d'un résidu sucré des glycopeptidolipides de surface, permet la classification des organismes MAC en 28 sérovars. Des méthodes de typage plus sophistiquées dirigées vers des cibles spécifiques des parois cellulaires sont à présent disponibles, telles que la méthode immuno-enzymatique (ELISA) avec des anticorps monoclonaux contre les principaux sérovars, et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC pour *high performance liquid chromatography*). Les sérovars 1 à 6, 8 à 11 et 21 sont actuellement attribués à *M. avium* et les sérovars 7, 12 à 20 et 25 à *M. intracellulare*. Cependant, aucun accord n'est obtenu pour les autres sérovars,

et certains isolats ne peuvent pas être typés (9). La tuberculose chez les oiseaux est habituellement causée par *M. avium* types 1, 2, ou 3. Si un de ceux-ci est trouvé, il peut être considéré comme étant la cause de la maladie. Si l'isolat n'est pas un de ceux-ci, une identification plus poussée doit être effectuée. Cependant, il faut tenir compte du fait que les lésions tuberculeuses superficielles chez les oiseaux en cage, surtout les psittacidés, peuvent être causées par *M. tuberculosis*. Dorénavant, si des colonies rugueuses de mycobactéries sont isolées à partir de tels oiseaux, elles doivent être testées pour une croissance à 42 °C. Si l'isolat ne se développe pas à 42 °C, *M. tuberculosis* doit être suspecté.

• Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques

Des tests génétiques fiables et spécifiques pour la détermination de l'espèce sont actuellement disponibles (22). Des sondes d'hybridation des acides nucléiques commercialisées sont devenues un « gold standard » pour la distinction entre les cultures de *M. avium* et de *M. intracellulare* ; *M. genavense* peut aussi être identifié avec ces tests.. Une autre sonde qui couvre MAC en totalité a aussi été développée, des souches MAC authentiques ont été décrites qui ne réagissaient pas avec les sondes spécifiques de *M. avium* et *M. intracellulare* (23). Ces tests utilisaient une sonde ADN simple brin complémentaire de l'ARN ribosomal de l'organisme cible et marquée par chemiluminescence. Les hybrides ADN-ARN marqués sont mesurés avec un luminomètre. Des méthodes moléculaires variées ont été rapportées pour l'identification des cultures de mycobactéries, incluant MAC. Une PCR multiplex pour faire la distinction entre *M. avium*, *M. intracellulare* et le complexe *M. tuberculosis* présente certains avantages (4). Le séquençage de l'ARNr 16S (10) ou avec l'amplification par PCR suivie par soit l'hybridation avec la sonde spécifique d'espèce soit l'analyse par des enzymes de restriction (5, 24, 29) peuvent aussi être utilisés. Bien que certaines de ces méthodes détectent théoriquement l'agent directement dans les échantillons de tissu, aucune d'entre elles n'a été validée pour cet usage. L'identification moléculaire de MAC est donc actuellement réalisée sur des organismes préalablement isolés par culture. Le séquençage du gène *hsp65* est considéré également comme utile pour distinguer les sous-espèces de *M. avium* (30).

En ce qui concerne le génotypage intra-espèces, l'électrophorèse en champ pulsé d'un grand fragment de restriction de l'ADN s'est avérée être d'une sensibilité élevée (12). Aussi, un nombre d'éléments mobiles d'ADN ont-ils été identifiés pour être exploités dans ce but. La séquence d'insertion IS1245, qui est en fait spécifique de *M. avium*, a été démontrée être la plus discriminante pour l'analyse des souches apparentées (2, 7). Une méthode normalisée consistant en l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) de l'IS1245 a été récemment proposée (31). L'infection des oiseaux était provoquée par un sous-ensemble particulier de souches de *M. avium* qui sont caractérisées par un profil RFLP hautement conservé avec IS1245 et IS901, spécifique, en plus des sérovars 1, 2 ou 3 (20).

Récemment, O'Grady *et al.* ont réalisé et étudié la RFLP en utilisant des sondes dérivées de IS901, IS1245 et IS1311 pour étudier l'épidémiologie moléculaire des infections à *M. avium* et *M. intracellulare*, en particulier pour acquérir une compréhension des sources d'infection chez l'homme (14).

Si des conditions de typage spécialisées ne sont pas disponibles, la probabilité que l'organisme isolé soit la cause de la maladie peut être établie avec les tests de pathogénicité. Il est préférable que ceux-ci soient effectués sur les espèces d'oiseaux étudiés, mais à défaut, une poule domestique ou une caille japonaise peut être utilisée. Les oiseaux jeunes adultes sont les meilleurs. Un inoculum est préparé en mettant un petit carré de papier d'aluminium et des billes de verre dans un récipient à vis, qui est ensuite stérilisé et pesé. Une anse de culture est ensuite placée sur le papier d'aluminium et le tout est repesé. Enfin, une solution saline normale stérile en quantité suffisante est additionnée pour obtenir une suspension de la culture à 0,1 mg/ml. Puis les oiseaux sont inoculés par voie intraveineuse avec 1 ml de la suspension. Si l'organisme est virulent, l'oiseau mourra en 5 à 6 semaines et l'oiseau aura alors des lésions étendues remplies de bacilles acido-résistants.

2. Méthodes immunologiques

Les tests en vue de l'exportation dépendent des conditions imposées par chaque pays importateur. En général, la tuberculation ou l'hémagglutination (antigène coloré) sont les tests les plus fréquemment utilisés dans le cas d'exportation de volailles.

a) Le test à la tuberculine

Le test le plus largement utilisé chez les volailles domestiques, et le seul test pour lequel il existe un réactif de référence international, est le test à la tuberculine. La tuberculine est le dérivé protéique purifié aviaire de référence (PPD, *Purified Protein Derivative*). Les oiseaux sont testés par inoculation intradermique dans le barbillon avec 0,05 ml ou 0,1 ml de tuberculine contenant environ 2 000 unités internationale (UI), en utilisant une aiguille très fine d'environ 10 mm × 0,5 mm. Le test est lu après 48 h et une réaction positive est un gonflement au point d'inoculation, allant d'un petit nodule ferme d'environ 5 mm de diamètre à un gros œdème s'étendant à l'autre barbillon et à la base du cou. Avec l'habitude, même des barbillons très petits sur des oiseaux immatures peuvent être inoculés avec succès. Cependant, chez les oiseaux immatures un peigne peut être utilisé, bien que les résultats ne soient pas aussi fiables. Le test à la

tuberculine des barbillons chez les dindes est beaucoup moins fiable que chez les volailles domestiques. L'inoculation au niveau des ailes a été recommandée comme étant plus efficace, mais il n'est pas encore aussi bon que chez les oiseaux domestiques. Les autres oiseaux peuvent aussi être testés au niveau des ailes, mais les résultats ne sont généralement pas satisfaisants. Les aires de la peau dénudée des canards Muscovy et de certaines espèces de faisans peuvent être utilisées, mais la fiabilité est douteuse et l'interprétation difficile. Le test au niveau des pattes des oiseaux aquatiques a aussi été décrit ; le test n'est pas très sensible et il est souvent compliqué par des infections au point d'inoculation.

Chez les faisans, le test à la tuberculine peut être réalisé dans l'un ou l'autre des deux sites. Dans la première, 0,05 ml ou 0,1 ml de tuberculine sont injectés dans la peau de la paupière inférieure. Un résultat positif est indiqué par un gonflement marqué au site de l'injection après 48 h. Alternativement, 0,25 ml de tuberculine sont injectés dans les muscles thoraciques et les oiseaux sont observés pendant 6 à 10 h. Les oiseaux infectés montreront des signes de dépression et seront séparés du troupeau, et il peut y avoir des cas de morts soudaines. Aucun signe clinique ne sera provoqué chez les oiseaux non-infectés.

b) Épreuve à l'antigène coloré

• Préparation de l'antigène

Un antigène coloré avec du vert malachite à 1 % est utilisé pour une épreuve rapide d'agglutination sur lame du sang total (21). La souche utilisée pour la préparation de l'antigène coloré doit être lisse et non agglutinée en suspension saline. Elle doit se conformer aux caractéristiques des espèces de *M. avium*.

Une souche qui détectera l'infection avec n'importe quel sérotype est recommandée pour être utilisée au lieu d'un sérotype spécifique qui est le plus probablement rencontré (en Europe le sérotype 2 pour les volailles domestiques, sérotype 1 pour les oiseaux aquatiques). Il peut être préférable d'utiliser une souche hautement spécifique pour le sérotype qu'il détecte. La spécificité des souches peut être déterminée seulement en les testant comme antigènes, bien qu'en général un antigène sérotype 2 détectera toujours une infection à sérotype 3 et inversement. Les souches sérotype 1 paraissent détecter plus souvent un large spectre d'infection et détecteront souvent aussi des infections à mycobactéries mycobactine-dépendantes ou *M. silvaticum*. Il n'y pas de raison de ne pas utiliser une culture contenant plus d'une souche de *M. avium*, pourvu qu'elle montre les propriétés désirées de sensibilité et de spécificité. La cohérence des résultats entre les lots serait plus facile avec l'utilisation de cultures pures.

Les organismes doivent être cultivés dans un milieu liquide convenable, tel que le milieu de Middlebrook 7H9 contenant du pyruvate de sodium à 1 % pour une meilleure culture. Une bonne culture doit être obtenue en 7 jours environ. Une culture liquide est utilisée comme semence pour la préparation de l'antigène en vrac.

L'antigène pour les épreuves d'agglutination est mieux cultivé sur milieu solide, tel que le milieu de Löwenstein-Jensen ou le milieu de Middlebrook 7H11, contenant du pyruvate de sodium à 1 % au lieu du glycérol, en utilisant des boîtes de Roux ou des grands flacons. L'utilisation de milieu solide permet au maximum la détection de n'importe quelle contamination, et les antigènes cultivés dans certain milieu liquide ne sont pas agglutinés par les anticorps spécifiques. La culture liquide doit être diluée (sur la base d'expérience) pour donner des colonies discrètes sur milieu solide. Celui-ci donne habituellement le meilleur rendement, et augmente à nouveau la chance de détecter des contaminations. Environ 10 ml d'inoculum sont d'ordinaire suffisants pour permettre de laver la surface totale, et produire assez d'humidité pour conserver dans les flacons l'air proche de 100 % d'humidité.

Les flacons sont incubés à 37 °C, et une bonne culture doit être obtenue en 14 à 21 jours avec la plupart des souches. L'antigène est récolté par l'addition de billes de verre stériles et 2 fois le volume de solution saline normale stérile (contenant 0,3 % de formol) comme pour l'inoculation des flacons. Le flacon est ensuite agité doucement pour enlever toute la culture et le produit de lavage est collecté dans un flacon stérile et ré-incubé à 37 °C pendant 7 jours. Les bacilles tués sont ensuite lavés 2 fois avec une solution saline normale stérile avec 0,2 % de formol par centrifugation et resuspension. Cette suite d'évènement est plus sûre que la méthode originale dans laquelle le lavage était effectué avant l'incubation qui tue les organismes. Enfin les organismes sont à nouveau centrifugés et resuspendus dans une solution saline normale stérile avec 0,2 % de formol et 0,4 % de citrate de sodium, à une concentration d'environ 10^{10} bactérie/ml. Ceci correspond à 10 fois la concentration équivalente au tube n°4 de l'échelle de McFarland.

Les cultures pour l'antigène doivent être examinées quotidiennement pour les contaminations pendant les 5 premiers jours d'incubation. La suspension faite à partir des cultures lavées est aussi réexaminée au microscope (pour les contaminants probables tels que les levures) et revérifier par culture pour s'assurer que le formol a tué les mycobactéries.

- **Validation de l'antigène**

Les cultures doivent être vérifiées par coloration de Gram pour la présence d'organismes autres que les mycobactéries.

Un ou plusieurs lots d'antigène agglutinant doivent être testés pour l'efficacité chez des oiseaux tuberculeux infectés naturellement ou artificiellement par comparaison avec une préparation de référence d'activité connue. L'activité rapportée à celle de la préparation de référence ne doit pas différer significativement de celle déclarée sur l'étiquette. Chaque flacon d'antigène doit être testé avec du sérum de poulet normal (pour détecter l'auto-agglutination) et du sérum de poulet positif vis-à-vis de *M. avium* de basse et haute teneur en anticorps. Ceci doit être fait, autant que possible, en comparant avec un lot précédent d'antigène coloré. Ces flacons donnant des réactions d'agglutination satisfaisantes avec l'antisérum peuvent être regroupés et l'antigène est alors coloré. Ceci est fait par addition de 3 ml d'une solution de vert malachite à 1 % pour 100 ml de suspension. Si possible, l'antigène coloré doit alors être vérifié en utilisant du sang total juste comme l'antigène non coloré avait été testé avec le sérum. L'antigène agglutinant peut être conservé pendant au moins 6 mois dans un réfrigérateur à 4 °C et beaucoup plus longtemps si congelé à -20 °C ou plus bas. Si un lot n'a pas été utilisé pendant une longue période il doit être revérifié surtout pour l'agglutination.

Le seul test de sécurité est la culture de l'antigène non lavé après 7 jours d'incubation, pour s'assurer que tous les bacilles sont morts.

- **Protocole**

L'épreuve d'agglutination à l'antigène coloré a été utilisée avec de bons résultats, surtout chez les oiseaux aquatiques domestiques et ornementaux. Une goutte (0,05 à 0,1 ml) de l'antigène est mélangée avec le même volume de sang total frais, obtenu par ponction veineuse, sur une porcelaine blanche ou une tuile en émail. Le mélange est agité pendant 2 min et observé pour l'agglutination. L'agglutination peut être grossière, et dans ce cas elle est évidente, ou très fine, et dans ce cas elle peut être le plus clairement vue comme une accumulation d'antigène coloré au vert malachite autour du bord de la goutte, laissant au centre une couleur rouge sang normale. Cette épreuve est surtout utilisée pour trier les grands troupeaux pour faire un choix immédiat, et a donc des avantages sur le test à la tuberculine pour le contrôle de la maladie, même chez les volailles domestiques. Il a aussi été suggéré qu'elle était plus fiable que le test à la tuberculine chez les volailles domestiques.

Note sur la limite de l'utilisation

Il semble que ni le test à la tuberculine avec la tuberculine aviaire ni l'épreuve d'agglutination à l'antigène coloré n'aient de valeur dans les cas d'infections à *M. tuberculosis* chez les oiseaux en cage.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Aucun vaccin n'est disponible.

La tuberculine aviaire est une préparation faite à partir de produits de culture de *M. avium* traités par la chaleur. Elle est utilisée par injection intradermique pour révéler l'hypersensibilité retardée comme un moyen d'identifier les oiseaux infectés avec ou sensibilisés par la même espèce de bacille tuberculeux.

Des lignes directrices pour la production de vaccins vétérinaires sont données au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont volontairement générales et doivent être complétées par les exigences nationales et régionales.

1. Gestion des semences bactériennes

a) Caractéristiques de la semence bactérienne

Les souches de *M. avium* utilisées pour préparer les cultures de la semence doivent être identifiées comme espèces par des tests appropriés. Elles doivent être sans organismes contaminants et être capables de donner un produit de qualité satisfaisante. Les souches recommandées par l'Union Européenne (UE), par exemple, sont D4ER et TB56. Il peut également être fait référence aux recommandations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (32).

b) Méthode de culture

Le matériel à ensemer est conservé comme un stock de culture lyophilisée. Si les cultures ont été développées sur milieu solide, il sera nécessaire d'adapter l'organisme au développement en culture liquide. Ceci est le plus facilement accompli par incorporation d'un morceau de pomme de terre dans les flacons de milieu liquide (ex. milieu de Watson Reid) Quand la culture a été adaptée au milieu liquide, elle peut être maintenue par passages de 2 à 4 semaines d'intervalle (1, 8).

Le substrat de culture pour la production doit être capable de donner un produit conforme aux normes de la Pharmacopée Européenne ou autres normes internationales (3). Il doit être sans ingrédients connus pour entraîner des réactions toxiques ou allergiques.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Les souches de *M. avium* utilisées comme semences des cultures doivent être dépourvus d'organismes contaminants.

Les lots de semences doivent être efficaces dans la production d'une tuberculine ayant une activité suffisante. Les tests nécessaires sont décrits dans la section C.4 ci-dessous.

2. Méthode de fabrication

La tuberculine aviaire peut être fabriquée par les 3 méthodes suivantes :

a) La vieille tuberculine

L'organisme est cultivé dans un bouillon glyciné, tué par chauffage dans un flux de vapeur et filtré pour éliminer les cellules. Le filtrat est concentré par chauffage et stérilisé par filtration.

b) La tuberculine concentrée à chaud sur milieu synthétique (CCMS)

Comme pour la vieille tuberculine, mais le bouillon glyciné est remplacé par un milieu synthétique (milieu synthétique modifié Dorset-Henley).

c) Dérivé protéique purifié (PPD)

Comme pour la tuberculine CCMS, mais, au lieu d'être concentrée par la chaleur, la protéine contenue dans le filtrat est précipitée chimiquement (le sulfate d'ammonium ou l'acide trichloracétique [TCA] sont utilisés) lavée et remise en suspension. La tuberculine PPD est recommandée car elle donne moins de réactions faussement positives et peut être normalisée avec plus de précision. Un agent de conservation antimicrobien qui ne provoque pas l'apparition de réactions faussement positives, tel que le phénol (pas plus de 0,5 % [w/v]) peut être additionné. Les dérivés du mercure ne doivent pas être utilisés. Le glycérol (pas plus de 10 % [w/v]) ou le glucose (2,2 % [w/v]) peuvent être additionnés comme stabilisateurs. Le produit est distribué aseptiquement dans des récipients en verre neutre stériles, qui sont ensuite scellés pour prévenir les contaminations. Le produit peut être lyophilisé.

3. Contrôles en cours de fabrication

Les flacons de production, inoculés à partir des cultures de semence convenable, sont incubés pendant une période de temps approprié. Les flacons montrant des contaminations ou une culture visiblement anormale doivent être éliminés après autoclavage. Au cours de l'incubation, les cultures qui se développent en surface deviennent humides et peuvent couler dans le milieu ou au fond du flacon. Dans les tuberculines PPD, le pH du précipité dissout (appelé tuberculine concentré) doit être de 6,6 à 6,7. Le niveau de protéine du concentré PPD est déterminé par la méthode de Kjeldahl. L'azote total et l'azote précipité par l'acide trichloracétique sont habituellement comparés.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Le test de stérilité est généralement réalisé selon la Pharmacopée Européenne ou d'autres lignes directrices (voir aussi le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »).

b) Innocuité

Pour vérifier l'absence de mycobactéries vivantes dans la tuberculine PPD, il convient d'utiliser la méthode de culture décrite ci-dessus. Cette méthode qui ne nécessite pas l'emploi d'animaux, est utilisée dans de nombreux laboratoires et son utilisation est encouragée plutôt que celle d'animaux. La méthode qui suit est celle qui était employée auparavant sur des animaux de laboratoire pour évaluer l'innocuité de la tuberculine PPD. Deux cobayes, chacun pesant pas moins de 250 g et qui n'ont pas été traités auparavant par un quelconque produit qui interférerait avec le test, sont inoculés par voie sous-cutanée avec 0,5 ml de tuberculine à tester. Aucun effet anormal ne doit apparaître dans les 7 jours.

c) Infectivité résiduelle

Les tests sur la tuberculine pour les mycobactéries vivantes peuvent être réalisés soit sur la tuberculine immédiatement avant qu'elle soit distribuée dans les récipients finaux ou sur des échantillons pris à partir des récipients finaux eux-mêmes. Un échantillon d'au moins 10 ml doit être prélevé et doit être injecté par voie intrapéritonéale ou par voie sous-cutanée chez au moins deux cobayes, en divisant également le volume à tester entre les cobayes. Il est souhaitable de prélever un échantillon plus important, 50 ml, et de concentrer les mycobactéries résiduelles par centrifugation ou filtration sur membrane. Les cobayes sont observés pendant au moins 42 jours, et examinés macroscopiquement à l'autopsie. Les lésions trouvées sont examinées microscopiquement et par culture.

Chaque récipient rempli doit être inspecté avant d'être étiqueté, et ceux montrant des anomalies doivent être éliminés.

d) Effet sensibilisant

Pour tester l'effet sensibilisant, 3 cobayes qui n'ont pas été traités auparavant par un produit qui pourrait interférer avec le test, sont chacun injectés par voie intradermique à 3 occasions avec l'équivalent de 500 UI de la préparation sous un volume de 0,1 ml. Chaque cobaye, ensemble avec chacun des 3 cobayes témoins qui n'ont pas été inoculés auparavant, est injecté par voie intradermique 15 à 21 jours après la 3^e injection avec la même dose de la même tuberculine. Les réactions des deux groupes de cobayes ne doivent pas être significativement différentes quand elles sont mesurées 24 à 28 h plus tard.

e) Activité

L'activité de la tuberculine aviaire est déterminée chez des cobayes sensibilisés avec *M. avium*, en comparaison avec une préparation de référence calibrée en UI.

Ne pas utiliser plus de 9 cobayes albinos, chacun pesant 400 à 600 g. Sensibiliser les cobayes par administration à chacun, par injection intramusculaire profonde, d'une dose convenable de *M. avium* inactivée ou vivante. Le test est réalisé entre 4 et 6 semaines plus tard comme suit : raser le flanc des cobayes suffisamment pour fournir un espace pour 3 à 4 injections sur chaque côté. Préparer au moins 3 dilutions de la tuberculine à contrôler et au moins 3 dilutions de la préparation de référence dans une solution tampon isotonique contenant 0,0005 % (w/v) de polysorbate 80 (Tween 80). Choisir les dilutions de sorte que les réactions produites aient un diamètre compris entre 8 et 25 mm. Répartir les dilutions à des sites d'injection randomisés selon un carré latin. Les dilutions sont injectées par voie intradermique sous des volumes de 0,1 ou 0,2 ml.

Après 24 à 28 h, les diamètres des réactions sont mesurés et les résultats sont calculés en utilisant des méthodes statistiques de référence, prenant les diamètres directement proportionnels aux logarithmes des concentrations des tuberculines. L'activité estimée doit être supérieure à 75 % et inférieure à 133 % de l'activité déclarée sur l'étiquette. Le test n'est pas valable à moins que les limites de confiance de l'erreur ($p = 0,95$) sont supérieures à 50 % et inférieures à 200 % de l'activité estimée. Si le lot manque un test d'activité, le test peut être répété une ou plusieurs fois pourvu que l'estimation finale de l'activité et des limites de confiance soit basée sur les résultats combinés de tous les tests.

Il est recommandé que la tuberculine aviaire contienne l'équivalent d'au moins 25 000 UI/ml, donnant une dose pour l'utilisation pratique de 2 500 UI/0,1 ml.

f) Spécificité

Un ou plusieurs lots de tuberculine peuvent être testés pour la spécificité ensemble avec une préparation de référence de tuberculine bovine en comparant les réactions produites chez les cobayes sensibilisés avec *M. bovis* en utilisant une procédure semblable à celle décrite dans la Section C.4.d. Chez les cobayes sensibilisés avec *M. bovis*, l'activité de la préparation de la tuberculine aviaire ne doit pas être supérieure à 10 % de l'activité de la préparation de référence de la tuberculine bovine utilisée dans le test d'activité.

g) Stabilité

Durant la conservation, la tuberculine liquide doit être protégée de la lumière et maintenue à une température de 5 ± 3 °C. Les préparations lyophilisées peuvent être stockées à des températures plus élevées (mais n'excédant pas 25 °C) protégées de la lumière. Durant l'utilisation, les périodes d'exposition à des températures plus élevées ou d'exposition directe aux rayons du soleil doivent être réduites au minimum.

Pourvu que les tuberculines soient stockées à une température entre 2 °C et 8 °C et protégées de la lumière, elles peuvent être utilisées jusqu'à la fin des périodes suivantes après le dernier test d'activité satisfaisant : tuberculines liquides PPD : 2 ans ; tuberculines lyophilisées PPD : 8 ans ; tuberculines CCMS diluées : 2 ans.

h) Agents de conservation

Les agents de conservation antimicrobiens ou autres substances qui peuvent être additionnés à une tuberculine, doivent avoir démontré qu'ils ne réduisent pas la sécurité et l'efficacité du produit. Les concentrations maximum permises pour le phénol est 0,5 % (w/v) et pour le glycérol 10 % (v/v). Le pH doit être entre 6,5 et 7,5.

i) Précautions d'emploi et mise en garde

L'expérience à la fois chez l'homme et l'animal a conduit à l'observation que la tuberculine diluée proprement injectée par voie intradermique aboutit à une réaction localisée au point d'injection sans manifestation généralisée. Même chez des personnes très sensibles, les réactions généralisées sévères sont extrêmement rares.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Un test pour l'absence de propriétés toxiques et irritantes doit être réalisé selon les recommandations de la Pharmacopée Européenne (voir aussi Section C.4.b)

b) Activité

L'activité des tuberculines doit être estimée par des méthodes biologiques. Ces méthodes doivent être utilisées pour les tuberculines CCMS et PPD ; elles sont basées sur la comparaison des tuberculines à tester avec les tuberculines de référence (voir aussi Section C.4.d).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANGUS R.D. (1978). Production of Reference PPD tuberculin for Veterinary use in the United States. *J. Biol. Stand.*, **6**, 221.
2. BONO M., JEMMI T., BERNASCONI C., BURKI D., TELENTI A. & BODMER T. (1995). Genotypic characterisation of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 371–373.
3. COUNCIL OF EUROPE (2000). Purified protein derivative (avian). In: European Pharmacopoeia, Fourth Edition. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 1694.
4. COUSINS D., FRANCIS B. & DAWSON D. (1996). Multiplex PCR provides a low-cost alternative to DNA probe methods for rapid identification of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2331–2333.
5. DEVALLOIS A., PICARDEAU M., GOH K.K., SOLA C., VINCENT V. & RASTOGI N. (1996). Comparative evaluation of PCR and commercial DNA probes for detection and identification to species level on *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2756–2759.
6. DVORSKA L., BULL T.J., BARTOS M., MATLOVA L., SVASTOVA P., WESTON R.T., KINTR J., PARMOVA I., VAN SOOLINGEN D. & PAVLIK I. (2003). A standardised restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for typing *Mycobacterium avium* isolates links IS901 with virulence for birds. *J. Microbiol. Methods*, **55**, 11–27.

7. GUERRERO C., BERNASCONI C., BURKI D., BODMER T. & TELENTI A. (1995). A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 304–307.
8. HAAGSMA J. & ANGUS R.D. (1995). Tuberculin production. In: *Mycobacterium bovis* Infections in Humans and Animals, Steele J.H. & Thoen C.O., eds. Iowa State University Press, Ames, USA, 73–84.
9. INDERLIED C.B., KEMPER C.A. & BERMUDEZ L.E.M. (1993). The *Mycobacterium avium* complex. *Clin. Microbiol. Rev.*, **6**, 266–310.
10. KIRSCHNER P., MEIER P.A. & BOTTGER E.C. (1993). Genotypic identification and detection of mycobacteria. In: *Diagnostic Molecular Microbiology*, Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C. & White T.C., eds. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 173–190.
11. LARSEN A.B. & MOON H.W. (1972). Experimental *Mycobacterium paratuberculosis* infection in chickens. *Am. J. Vet. Res.*, **33** (6), 1231–1235.
12. MAZUREK G.H., HARTMAN S., ZHANG Y., BROWN B.A., HECTOR J.S.R., MURPHY D. & WALLACE R.J. (1993). Large DNA restriction fragment polymorphism in the *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare* complex: a potential epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 390–394.
13. MIJS W., DE HAAS P., ROSSAU R., VAN DER LAAN T., RIGOUTS L., PORTAELS F. & VAN SOOLINGEN D. (2002). Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* to bird-type isolates and *M. avium* subsp. *hominissuis* for the human/porcine type of *M. avium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 1505–1518.
14. O'GRADY D., FLYNN O., COSTELLO E., QUIGLEY F., GOGARTY A., MCGUIRK J., O'ROURKE J. & GIBBONS N. (2000). Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium avium* isolates from animal and human sources. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **4**, 278–281.
15. PAVLIK I., SVASTOVA P., BARTL J., DVORSKA L. & RYCHLIK I. (2000). Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **7**, 212–217.
16. POCKNELL A.M., MILLER B.J., NEUFELD J.L. & GRAHN B.H. (1996). Conjunctival mycobacteriosis in two emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Vet. Pathol.*, **33** (3), 346–348.
17. REALINI L., DE RIDDER K., HIRSCHL B. & PORTAELS F. (1999). Blood and charcoal added to acidified agar media promote the growth of *Mycobacterium genavense*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **34**, 45–50.
18. REALINI L., DE RIDDER K., PALOMINO J., HIRSCHL B. & PORTAELS F. (1998). Microaerophilic conditions promote growth of *Mycobacterium genavense*. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2565–2570.
19. REALINI L., VAN DER STUYFT P., DE RIDDER K., HIRSCHL B. & PORTAELS F. (1997). Inhibitory effects of polyoxyethylene stearate, PANTA, and neutral pH on growth of *Mycobacterium genavense* in BACTEC primary cultures. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2791–2794.
20. RITACCO V., KREMER K., VAN DER LAAN T., PIJNENBURG J.E.M., DE HAAS P.E.W. & VAN SOOLINGEN D. (1998). Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int. J. Tuberculosis Lung Dis.*, **2**, 242–251.
21. ROZANSKA M. (1965). Preparation of antigen for whole blood rapid agglutination test and its specificity for diagnosis of avian tuberculosis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, **9** (1), 20–25.
22. SAITO H., TOMIOKA H., SATO K., TASAKA H. & DAWSON D.J. (1990). Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex by using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 1694–1697.
23. SOINI H., EEROLA E. & VILJANEN M.K. (1996). Genetic diversity among *Mycobacterium avium* complex Accu-Probe-positive isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 55–57.
24. TELENTI A., MARCHESI F., BALZ M., BALLY F., BOTTGER E.C. & BODMER T. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 175–178.

25. TELL L.A., WOODS L. & CROMIE R.L. (2001). Tuberculosis in birds. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 180–203.
26. THOREL M.F., HUCHZERMAYER H. & MICHEL A.L. (2001). *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* infection in mammals. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 204–218.
27. THOREL M.F., HUCHZERMAYER H., WEISS R. & FONTAINE J.J. (1997). *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. *Vet. Res.*, **28**, 439–447.
28. THOREL M.F., KRICHEVSKY M. & LEVY-FREBAULT V.V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40** (3), 254–260.
29. TRUEBA F., FABRE M. & SAINT-BLANCARD P. (2004). Rapid identification of *Mycobacterium genavense* with a new commercially available molecular test, INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2. *J. Clin. Microbiol.*, **42** (9), 4403–4404.
30. TURENNE C.Y., SEMRET M., COUSINS D.V., COLLINS D.M. & BEHR M.A. (2006). Sequencing of hsp65 distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.*, **44** (2), 433–440.
31. VAN SOOLINGEN D., BAUER J., RITACCO V., CARDOSO LEAO S., PAVLI I., VINCENT V., RASTOGI N., GORI A., BODMER T., GARZELLI C. & GARCIA M.J. (1998). IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3051–3054.
32. World Health Organization (WHO) (1987); Requirements for Biological Substances No. 16, Annex 1: Requirement for Tuberculins; Technical Report Series No. 745, WHO, Geneva, Switzerland, 31–59.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la tuberculose aviaire (se reporter à la liste de la partie 3 de ce Manuel Terrestre ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int)

PESTE DU CANARD

RÉSUMÉ

L'entérite virale ou peste du canard est une maladie contagieuse aiguë due à un herpesvirus qui affecte les canards, les oies et les cygnes (oiseaux de l'ordre des Ansériformes). Le diagnostic repose sur les signes cliniques, les lésions macroscopiques et histologiques et est confirmé par la mise en évidence de l'agent étiologique par isolement ou amplification en chaîne par polymérase (PCR).

Identification de l'agent pathogène : le virus peut être isolé à partir du foie, de la rate et des reins d'animaux morts de l'infection. L'isolement peut être réalisé sur canetons sensibles, qui expriment les signes de la maladie ; sur membrane chorio-allantoïdienne d'œufs embryonnés de canards de Barbarie ou sur cultures de cellules embryonnaires de canard. L'identification du virus est possible grâce à un antisérum spécifique qui inhibe soit le processus pathologique chez les embryons soit les effets cytopathogènes (ECP) sur cellules en culture. Une alternative consiste en l'utilisation d'épreuves d'immunofluorescence directe ou indirecte sur cellules en culture. Il est également possible de mettre l'ADN viral en évidence par PCR dans l'œsophage, le foie et la rate d'animaux infectés ou sur cellules ou embryons dans le cadre du protocole d'isolement du virus.

Épreuves sérologiques : les épreuves sérologiques présentent peu d'intérêt pour le diagnostic de la maladie. Des tests de séroneutralisation sur œufs ou sur culture cellulaire ont été utilisés pour décrire l'exposition au virus d'oiseaux sauvages.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : un vaccin vivant atténué par voie sous-cutanée ou intramusculaire est disponible pour les animaux âgés d'au moins 2 semaines. Le virus vaccinal ne semble pas diffuser. Un vaccin inactivé s'est avéré efficace expérimentalement mais n'a pas été testé à large échelle et n'est pas autorisé.

A. INTRODUCTION

La peste du canard est une affection virale aiguë, parfois chronique qui affecte les canards, les oies et les cygnes, tous membres de la famille des Anatidés dans l'ordre des Ansériformes. L'agent étiologique, un herpesvirus, fait partie de la sous-famille des *alphaherpesvirinae* dans la famille des *Herpesviridae*. La peste du canard est également dénommée herpesvirose des anatidés, eendenpest ou entenpest. L'infection n'a pas été décrite chez d'autres espèces d'oiseaux, ni chez les mammifères ou l'homme.

Chez le canard domestique, la peste du canard a été décrite de l'âge de 7 jours à l'âge de la reproduction. Dans des élevages indemnes, l'expression clinique débute généralement par l'apparition d'une mortalité brutale, forte et persistante associée à une chute de ponte marquée. Dans des troupeaux partiellement immunisés et chroniquement infectés la mortalité est plus rare. Les animaux qui survivent peuvent excréter du virus dans les fientes ou à la surface des œufs pendant des années (18, 21). Récemment, une forme de peste concernant seulement les canards de Barbarie a été décrite aux États-Unis d'Amérique (2, 5).

Les signes cliniques et les lésions macroscopiques sont variables en fonction de l'espèce, de l'âge, du sexe des oiseaux atteints, ainsi que selon la virulence de la souche virale. Chez les canards reproducteurs, on observe des écoulements oculaires, des paupières collées avec de la photophobie, de la polydypsie, une anorexie, une diarrhée liquide et du jetage. Les oiseaux présentent souvent des plumes ébouriffées et les orifices souillés. Les oiseaux malades se maintiennent debout en prenant appui sur leurs ailes, mais ils sont faibles et apathiques. Chez les canetons de 2 à 7 semaines, la mortalité peut être plus faible que chez des animaux plus âgés et les symptômes sont de la déshydratation, une perte de poids, une cyanose du bec et la présence de sang au niveau des orifices.

À l'autopsie, les canards adultes morts ont peu de signes d'émaciation. Chez les mâles reproducteurs, un prolapsus du pénis est décrit. Chez les reproducteurs femelles, on observe des hémorragies au niveau des follicules ovariens. Les lésions macroscopiques se caractérisent par une atteinte vasculaire avec des hémorragies tissulaires et la présence de sang dans la cavité générale, des éruptions, des hémorragies en anneau ou la présence de fausses membranes à la surface de la muqueuse digestive, des lésions des organes lymphoïdes et des lésions dégénératives des viscères. Lorsqu'elles sont présentes simultanément, ces lésions sont pathognomoniques de la peste du canard. Les lésions macroscopiques et microscopiques rencontrées chez le canard Pékin ont été décrites (19). Les lésions histologiques se caractérisent par une atteinte vasculaire et ses conséquences sur les viscères. Des inclusions intranucléaires éosinophiles et des inclusions intracytoplasmiques sont présentes dans les cellules épithéliales du tube digestif de façon typique.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Les prélèvements de choix pour l'isolement du virus de la peste du canard (VPC) sont le foie, la rate ou le rein, après homogénéisation dans un tampon contenant des antibiotiques puis clarification par centrifugation à faible vitesse (1 800 g). L'isolement est réalisé après inoculation des homogénats à des cellules en culture, des canetons ou des œufs embryonnés de canard.

a) Cellules en culture

Malgré des échecs rapportés, les cellules en culture sont le support de choix pour l'isolement du VPC. Les essais d'isolement doivent être réalisés sur culture primaire de fibroblastes embryonnaires de canard (DEF) (23), de préférence de canards de Barbarie (MDEF) (9, 14). Les cellules hépatiques d'embryon de canards de Barbarie (MDEL) sont considérées comme encore plus sensibles à l'infection (R.E. Gough, communication personnelle). Les tapis cellulaires cultivés en MEM (*Eagle's Minimal Essential Medium*) contenant 10 % de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine, 0,17 % de bicarbonate de sodium et de la gentamicine sont lavés avec du MEM sans sérum, puis inoculés avec l'échantillon homogénéisé et clarifié, potentiellement contaminé avec le virus. Après une incubation de 1 h à 37 °C pour permettre l'adsorption du virus, les cellules sont cultivées en milieu MEM supplémenté avec 2 % de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine, 0,17 % de sodium bicarbonate et de la gentamicine sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. L'effet cytopathogène (ECP) se caractérise par l'apparition de cellules arrondies et coalescentes qui augmentent de taille et se nécrosent en 2 à 4 jours. L'identification du virus en culture est possible par une méthode d'immunofluorescence directe ou indirecte (voir Chapitre B.1.d.). Les cellules peuvent également être fixées puis colorées avec de l'hématoxyline-éosine afin de visualiser la formation des syncytiums, les inclusions intranucléaires ainsi que la granulation marquée du cytoplasme. Il a été décrit (11) que l'isolement du virus de la peste du canard sur cellules MDEF est facilité par l'incubation à une température de 39,5 à 41,5 °C. Toutefois, une température aussi élevée ne semble pas indispensable pour l'isolement viral qui est souvent réalisé à 37 °C. Il peut être nécessaire de réaliser plusieurs passages sur cellules afin d'isoler le virus. La méthode d'isolement peut être adaptée à la méthode de détection des plages de lyse en utilisant un milieu de culture contenant 1 % d'agarose. Du fait que le virus peut être en position intracellulaire, les passages de culture doivent être réalisés en trypsinant les cellules potentiellement infectées et en les repiquant, ainsi qu'en inoculant des cellules fraîches avec du surnageant de culture infecté d'un passage précédent.

b) Canetons

Des canetons sensibles âgés de 1 jour inoculés par voie intramusculaire meurent en 3 à 12 jours ; des canetons témoins non inoculés et élevés séparément doivent être utilisés comme témoins. Les canetons de Barbarie (*Cairina moschata*) sont plus sensibles que les canetons Pékin blancs. Des lésions macroscopiques et microscopiques caractéristiques doivent être observées à l'examen post-mortem. Le diagnostic peut être confirmé soit en vaccinant les canetons avant une infection avec l'isolat viral soit en utilisant une méthode d'immunofluorescence. Néanmoins le vaccin peut s'avérer inefficace contre certaines souches virales (13). L'expérience des auteurs les conduit à penser qu'en cas d'infection naturelle cette méthode est plus sensible que l'isolement en culture cellulaire.

c) Embryons de canard

L'isolement de virus peut être réalisé par inoculation d'œufs embryonnés de canard de Barbarie âgés de 9 à 14 jours sur la membrane chorio-allantoïdienne. Les embryons peuvent mourir, présentant des hémorragies étendues caractéristiques 4 à 10 jours après l'inoculation. 2 à 4 passages successifs utilisant des homogénats de membranes chorio-allantoïdiennes peuvent être nécessaires pour isoler le virus. Cette méthode est moins sensible que l'inoculation de canetons de 1 jour.

Les œufs embryonnés de poulet sont peu sensibles à l'infection par des souches sauvages de virus de la peste du canard. Toutefois, le virus peut être adapté aux œufs embryonnés de poulet par passages successifs. Les embryons de canard Pékin présentent une sensibilité variable aux souches du VPC.

d) Méthodes immunologiques

L'identification d'un virus nouvellement isolé est possible par la méthode de séroneutralisation sur œufs embryonnés ou sur cultures cellulaires. Un test de formation de plages de lyse sur cellules d'embryon de canard a été décrit (4). Dans le laboratoire des auteurs, une méthode en microplaques utilisant des cultures primaires de cellules MDEF ou MDEL est utilisée. Sous réserve que le titre du sérum soit assez élevé, une épreuve d'immunofluorescence directe ou indirecte sur cellules DEF, MDEF ou MDEL s'avère l'épreuve la plus sensible après l'isolement sur des canetons âgés de 1 à 9 jours (8). Il est possible d'utiliser une épreuve d'hémagglutination passive inversée (6) qui semble moins sensible que l'immunofluorescence et que le test de formation des plages de lyse. Une épreuve de détection du virus sur coupes paraffinées de foie et de rate de canards infectés expérimentalement par coloration des antigènes par une méthode d'immunopéroxydase a été décrite (12) et pourrait être utilisée pour le diagnostic. L'identification du virus peut également être confirmée par microscopie électronique négative, mais cette méthode n'est pas suffisante pour certifier que l'herpesvirus observé est le virus de la peste du canard. Une méthode utilisant un sérum hyperimmun en microscopie électronique a récemment été mise au point (15).

e) Méthodes moléculaires

Récemment, la mise en évidence du virus de la peste du canard par réaction d'amplification en chaîne par la polymérase (PCR) a été décrite (10, 11, 16, 17). Des amorces ont été définies qui permettent d'amplifier l'ADN viral présent dans différents tissus tels que l'œsophage, le foie et la rate suite à un épisode clinique et après passage du virus sur embryons de canard de Barbarie. Un exemple de protocole PCR est décrit ci-après.

- **Méthode PCR¹**

La méthode d'extraction de l'ADN décrite ci-après peut être mise en œuvre soit sur des suspensions cellulaires provenant de cultures infectées, soit sur un broyat de tissu en suspension à 10 %, soit à partir d'écouvillons cloacaux placés dans un milieu de transport. Cette méthode permet de préparer de l'ADN viral utilisé comme un témoin positif pour les tests de PCR.

- **Extraction d'ADN viral**

Note : toutes les manipulations de réactifs dans les étapes i à v doivent être réalisées dans un poste de sécurité microbiologique.

- i) Placer dans un microtube de 1,5 ml, 400 µl d'un broyat de tissu en suspension à 10 %, centrifuger à 16 000 *g* pendant 5 min. Transférer le surnageant dans un nouveau tube et passer à l'étape ii ;
- ii) Pour les cultures cellulaires ou les écouvillons cloacaux, ajouter 400 µl de l'échantillon ou le surnageant obtenu à l'étape i ci-dessus dans un microtube de 1,5 ml et centrifuger entre 16 000 et 20 000 *g* pendant 45 min afin de culoter le virus ;
- iii) Éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 200 µl de tampon Tris/acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) ;
- iv) Ajouter 10 µl d'une solution de protéinase K à 5 µg/µl pour obtenir une concentration finale de 0,2 µg/µl, mélanger vigoureusement et incubé à 56 °C pendant 1 h ;
- v) Ajouter 25 µl d'une solution de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 10 % pour obtenir une concentration finale en SDS de 1 %, mélanger vigoureusement et incubé à 37 °C pendant 1 h ;
- vi) Ajouter 15 µl de NaCl 5 M pour obtenir une concentration finale 0,3 M et mélanger vigoureusement ;
- vii) Ajouter 300 µl de phénol froid tamponné avec du Tris/HCl, pH 8,0, et mélanger en retournant le tube 50 fois ;

1 Fournie par Dr W.R. Hansen, US Geological Survey, Biological Resources Division, National Wildlife Health Center, 6006, Schroeder Road, Madison, WI 53711, États-Unis d'Amérique. Cette méthode nécessite les produits commerciaux suivants : GeneAmp PCR Reagent Kits comprenant dNTPs, 10 amplification buffer for hot start PCR, Taq DNA polymérase, Lambda PCR control reagents, et des billes Ampliwax (Applied Biosystems), ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (échelle 100 pb) (Invitrogen).

- viii) Centrifuger le microtube à 16 000 **g** pendant 5 min et transférer la phase aqueuse superficielle (contenant l'échantillon) dans un nouveau tube ;
- ix) Renouveler l'extraction phénolique (étapes vii et viii) ;
- x) Ajouter 500 µl d'éther dans le tube, mélanger vigoureusement, et centrifuger à 16 000 **g** pendant 1 min ;
- xi) Éliminer la phase aqueuse superficielle (éther) et renouveler l'extraction à l'éther (étape x) ;
- xii) Chauffer le tube avec le couvercle ouvert à 56 °C pendant environ 15 min jusqu'à disparition de l'odeur d'éther ;
- xiii) Séparer en deux le contenu du tube et ajouter 2,25 fois le volume de chaque échantillon d'éthanol absolu, mélanger les tubes en les retournant plusieurs fois et laisser à température ambiante (22 °C) pendant 30 min ;
- xiv) Centrifuger le tube à 16 000 **g** pendant 45 min et éliminer le surnageant ;
- xv) Ajouter 200 µl d'éthanol à 70 % pour laver doucement le culot puis centrifuger à 16 000 **g** pendant 15 min ;
- xvi) Éliminer le surnageant et sécher le culot à 56 °C pendant 30 à 45 min avec le couvercle du tube ouvert ;
- xvii) Reprendre l'ADN dans 30 µl d'eau distillée exempte de RNase et DNase ;
- xviii) Stocker l'échantillon à 4 °C jusqu'à l'amplification (si elle a lieu dans les jours suivants) ou à –20 °C en cas de stockage plus long.

- **Amplification en chaîne par polymérase**

Un premier mélange réactionnel (tampon d'amplification × 10, amorces, dNTPs) est préparé dans un poste de sécurité microbiologique en suivant les recommandations du fabricant du kit de diagnostic pour une PCR « hot start » et déposé dans les microtubes correspondant aux échantillons à amplifier, y compris le témoin d'amplification Lambda (Lambda control). Les tubes sont scellés par l'ajout de billes de cire Ampliwax® suivi d'un chauffage à 80 °C. Ils peuvent ensuite être stockés à 4 °C pendant 1 à 2 mois.

Les amorces permettant l'amplification du gène de la polymérase du virus de la peste du canard sont les suivantes :

Amorce 1 : 5'-GAA-GGC-GGG-TAT-GTA-ATG-TA-3' (sens)

Amorce 2 : 5'-CAA-GGC-TCT-ATT-CGG-TAA-TG-3' (antisens)

- i) Un second mélange réactionnel contenant la Taq polymérase, est préparé selon les recommandations du fabricant du kit le jour du test et distribué dans les tubes, y compris les témoins (ADN viral et contrôle Lambda) ;
- ii) Ajouter 10 µl de suspension d'ADN provenant des tubes stockés après l'étape d'extraction d'ADN dans les tubes PCR contenant les premiers mélanges réactionnels adéquats et pré-identifiés ;
- iii) Placer de l'ADN du VPC à la concentration de 1 pg/10 µl dans un tube témoin positif et 10 µl d'eau distillée dans le tube témoin sans ADN. Ajouter 10 µl d'ADN Lambda fourni dans le kit et 10 µl d'eau dans les tubes témoins positif et négatif Lambda respectivement ;
- iv) Placer tous les tubes dans le thermocycleur programmé de la façon suivante :
 - Un cycle : 94 °C pendant 2 min
37 °C pendant 1 min
72 °C pendant 3 min
 - 35 cycles : 94 °C pendant 1 min
55 °C pendant 1 min
72 °C pendant 2 min
 - Un cycle : 72 °C pendant 7 min
4 °C jusqu'à l'arrêt du thermocycleur.

Les tubes PCR doivent être stockés à 4 °C jusqu'à révélation des produits d'amplification.

- **Électrophorèse des produits de PCR**

- Du tampon TAE × 1 (40 mM Tris acétate, 1 mM EDTA, pH 8,3) est préparé extemporanément à partir d'une solution stock × 10. Il sera utilisé pour la préparation du gel d'agarose ainsi que pour la migration dans la cuve d'électrophorèse ;
- Une solution d'agarose à 1 % est préparée en tampon TAE, chauffée pour dissoudre l'agarose et une fois refroidie, coulée sur un support de gel muni d'un peigne ;
- Le gel polymérisé est placé dans une cuve d'électrophorèse et du tampon TAE est ajouté ;
- Les produits d'amplification, y compris l'ADN viral et les contrôles Lambda sont additionnés de 1 µl de tampon de chargement (bleu de bromophénol 0,25 % [poids/vol.], xylène cyanol 0,25 % [poids/vol.], 0,01 M Tris/HCl, pH 8,0, et glycérol 50 % [vol./vol.]) et 10 µl de chaque échantillon sont déposés dans les puits du gel. Un marqueur de poids moléculaire (échelle de 100 pb) est ajouté dans les puits aux deux extrémités du gel ;
- Faire migrer le gel pendant 1 h à 120 volts puis le colorer par immersion dans une solution de bromure d'éthidium à 1 % pendant 20 min. Décolorer le gel pendant 45 min dans de l'eau désionisée et visualiser le gel sous UV. Photographier le gel afin de conserver les résultats.

- **Interprétation des résultats**

Une bande correspondant à l'amplification d'un fragment de 500 pb pour le témoin Lambda indique le bon déroulement de la phase d'amplification. Une bande de 446 pb dans le tube témoin positif viral confirme l'amplification du VPC par les amorces sélectionnées. Une bande de 446 pb dans les tubes à tester indique la présence d'ADN du VPC dans les échantillons. Aucun produit d'amplification ne doit être mis en évidence dans les tubes témoins négatifs (Lambda et ADN viral). En cas de présence d'un produit d'amplification dans les témoins négatifs, une contamination croisée s'est produite au cours de la manipulation et le test doit être renouvelé.

f) Variation des souches virales

Bien que les souches de virus diffèrent fortement en ce qui concerne la virulence, elles varient peu sur le plan antigénique.

2. Épreuves sérologiques

Les épreuves sérologiques présentent peu d'intérêt pour le diagnostic des infections aiguës par le virus de la peste du canard, mais des tests basés sur une séroneutralisation sur œufs embryonnés ont été développés pour mettre en évidence une réponse sérologique chez les oiseaux sauvages. La réponse immunitaire humorale en cas d'infection naturelle est souvent de faible intensité et les anticorps sont peu persistants (7) ; il est supposé que l'immunité à médiation cellulaire joue également un rôle dans l'infection (18). Toutefois, la détection d'anticorps neutralisants dans le sérum est possible. Des tests de séroneutralisation (22) à virus variable et sérum constant peuvent être mis en œuvre sur des embryons de poulet ou de canard en utilisant des souches virales adaptées aux embryons, ainsi que sur culture cellulaire. Des index de séroneutralisation (28) de 0 à 1,5 ont été mis en évidence sur des gibiers d'eau non-exposés au virus alors qu'un index $\geq 1,75$ semble indiquer un contact préalable avec le virus (3). Les sérums peuvent par ailleurs être testés par la méthode à virus constant et sérum variable. Dans le laboratoire de l'auteur, une épreuve en microplaque sur cellules MDEF ou DEF est utilisée. Des dilutions sériées au demi de chaque échantillon de sérum (préalablement inactivé à 56 °C) sont préparées dans 50 µl de milieu de culture MEM sans sérum dans des plaques de microtitrage. Environ 10^2 DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) de virus dans 50 µl de milieu sont ajoutées dans chaque puits et le mélange est incubé pendant 1 h à 37 °C. Une suspension de cellules MDEF ou DEF en milieu MEM supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 0,17 % de bicarbonate de sodium et 10 % de sérum de veau fœtal est ajustée à 3×10^5 cellules/ml. Les cellules sont ensuite ajoutées sur les plaques à raison de 100 µl de suspension cellulaire par puits et sont incubées jusqu'à 96 h à 37 °C en atmosphère humide enrichie en CO₂ à 5 %. Après incubation, les cellules sont examinées quotidiennement au microscope puis fixées en tampon salin formolé à 10 % et colorées avec 1 % de cristal violet. Les plaques sont observées macroscopiquement. Le titre d'activité neutralisante est exprimé comme l'inverse de la dilution la plus élevée à laquelle l'ECP n'est plus visible, indiquant que la neutralisation du virus a été totale. Un titre inférieur à 3 log₂ est généralement considéré comme négatif. Un titre ≥ 8 est considéré comme significatif et indique l'exposition au virus de la peste du canard (7). Les anticorps neutralisants peuvent également être mis en évidence en utilisant des cultures cellulaires en mettant en contact du sérum à une seule dilution, à savoir au 1/10, avec 100 à 200 DICT₅₀ de virus puis en recherchant la présence de virus non neutralisé dans la culture cellulaire par immunofluorescence. Bien que cette méthode ne soit pas quantitative, elle peut s'avérer utile pour tester un grand nombre de sérums. Ces dernières méthodes, à virus constant et sérum variable, sont beaucoup plus économiques en sérum que les méthodes de détermination d'index de neutralisation.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Un vaccin vivant atténué est disponible pour la maîtrise de la peste du canard chez les oiseaux de plus de 2 semaines d'âge (18, 19). Les canards de chair ou les reproducteurs peuvent être vaccinés par voie sous-cutanée ou intramusculaire. Le vaccin ne semble pas diffuser par contact entre animaux vaccinés et canards sentinelles non vaccinés puisque ces derniers restent sensibles à l'infection.

Un vaccin inactivé a été décrit comme étant aussi efficace que le vaccin vivant (20). Ce vaccin a été testé uniquement en conditions expérimentales et non à grande échelle et n'est pas autorisé.

Les lignes directrices pour la production des vaccins vétérinaires sont décrites dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices énoncées ci-après ainsi que dans le Chapitre 1.1.8. se veulent générales et peuvent être complétées par des recommandations nationales ou régionales.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Le vaccin contre la peste du canard peut être préparé à partir d'une souche virale atténuée par passages successifs sur œufs embryonnés de poulet. Aux États-Unis d'Amérique, le lot de semence primaire a été importé des Pays-Bas et a subi 41 à 46 passages.

b) Méthode de culture

Le lot de semence primaire doit être cultivé sur des œufs embryonnés de poulets exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) par inoculation sur la membrane chorio-allantoïdienne puis incubation à 37 °C. La souche doit être stockée à une température ≤ -70 °C sous forme d'homogénat de membrane chorio-allantoïdienne en tampon salin.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Le lot de semence primaire doit être indemne de virus exogène pathogène pour les canards, les poulets ou les dindes. Il doit de plus être indemne de contaminants bactériens, fongiques et de mycoplasmes.

L'identité du virus doit être confirmée par un test de séroneutralisation avec un anticorps spécifique par la méthode à sérum constant et virus variable. Ce test doit être réalisé sur œufs embryonnés de poulet. L'anticorps doit réduire le titre viral au moins de $10^{1,75}$ DLE₅₀ (dose létale pour 50 % des embryons).

Le pouvoir immunogène du vaccin peut être évalué sur des canards sensibles à la peste du canard ou sur des canetons par administration intramusculaire du vaccin puis inoculation de virus par voie intramusculaire 21 jours plus tard. Les oiseaux vaccinés doivent survivre à l'épreuve infectieuse alors que les non vaccinés doivent mourir. Ce test doit être réalisé sur le lot de semence primaire puis régulièrement pour chaque lot de vaccin produit. Pour la commercialisation des lots, le titre viral doit être une indication fiable de l'activité du vaccin.

Après congélation à une température ≤ -70 °C, le vaccin peut être stocké pendant au moins 1 an sans diminution du titre viral. Après décongélation, le vaccin doit être conservé à 4 °C et utilisé rapidement ; il ne doit pas être recongelé.

2. Méthode de fabrication

Le vaccin est produit sur œuf embryonné de poulet EOPS inoculé sur la membrane chorio-allantoïdienne et incubé à 37 °C. La plupart des morts d'embryons surviennent dans les 48 à 96 h après l'inoculation. Les embryons, les membranes chorio-allantoïdiennes ainsi que les fluides chorio-allantoïdiens sont prélevés, mélangés, homogénéisés dans du tampon salin et clarifiés par centrifugation lente (1 800 g). La préparation est diluée et un stabilisateur est ajouté. Elle est ensuite conditionnée en tubes et congelée à une température maximale de -70 °C.

3. Contrôles en cours de fabrication

Les œufs inoculés sont mirés 24 h après afin d'écarter les embryons morts de façon non spécifique.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests permettant de vérifier la stérilité et l'absence de contamination sont décrits dans le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Un lot de canetons de 1 jour, sensibles à la peste du canard, sont infectés par voie sous-cutanée ou intramusculaire avec une dose vaccinale 10 fois supérieure à celle recommandée et observés pendant 7 à 14 jours afin de détecter d'éventuels effets secondaires.

Le produit final doit être exempt de contamination bactérienne, fongique et de mycoplasmes ainsi que de virus potentiellement pathogènes pour les volailles.

c) Activité

Le titre viral du vaccin doit être déterminé sur des œufs embryonnés de poulet inoculés sur la membrane chorio-allantoïdienne et incubés à 37 °C. Le vaccin doit contenir au minimum $10^{3,0}$ DLE₅₀ par dose au moment de son utilisation.

d) Durée de l'immunité

L'immunité conférée par la vaccination doit durer au minimum jusqu'à la fin de la période de ponte. Il est recommandé de revacciner les animaux tous les ans (19).

e) Stabilité

Stocké à une température maximale de –70 °C, le vaccin est stable pendant 1 an. Un test d'activité doit être renouvelé à l'issue de cette période afin de déterminer si le titre viral est resté constant. Après décongélation, le vaccin ne doit pas être recongelé mais doit être conservé à 4 °C pendant au maximum 1 semaine. Les vaccins lyophilisés doivent être stockés entre 4 et 8 °C et utilisés avant la date d'expiration.

f) Agents de conservation

Le vaccin ne contient pas d'agents de conservation.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Aucune.

5. Contrôles du produit fini

Le vaccin se présente sous forme de flacons de vaccin concentré et de diluant stérile (PBS) sur lequel les tests de stérilité ont été réalisés (voir Section C.4.a).

a) Innocuité

Aucun test supplémentaire ne doit être réalisé après les contrôles de lots.

b) Activité

Aucun test supplémentaire ne doit être réalisé après les contrôles de lots.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BURGESS E.C. & YUILL T.M. (1981). Increased cell culture incubation temperatures for duck plague virus isolation. *Avian Dis.*, **25**, 222–224.
2. CAMPAGNOLO E.R., BANERJEE M., PANIGRAHY B. & JONES R.L. (2001). An outbreak of duck viral enteritis (duck plagues) in domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata domestica*) in Illinois. *Avian Dis.*, **45**, 522–528.

3. DARDIRI A.H. & HESS W.R. (1967). The incidence of neutralizing antibodies to duck plague virus in serums from domestic ducks and wild waterfowl in the United States of America. *Proceedings of the Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, 225–237.
4. DARDIRI A.H. & HESS W.R. (1968). A plaque assay for duck plague virus. *Can. J. Comp. Med.*, **32**, 505–510.
5. DAVISON S., CONVERSE K.A., HAMIR A.N. & ECKORAGE R.J. (1993). Duck viral enteritis in domestic Muscovy ducks in Pennsylvania. *Avian Dis.*, **37**, 1142–1146.
6. DENG M.Y., BURGESS E.C. & YUILL T.M. (1984). Detection of duck plague virus by reverse passive haemagglutination test. *Avian Dis.*, **28**, 616–628.
7. DOCHERTY D.E. & FRANSON C.J. (1992). Duck Virus Enteritis. *In: Veterinary Diagnostic Virology*, Castro A.E. & Heuschele W.P., eds. Mosby Year Book, St Louis, Missouri, USA, 25–28.
8. ERICKSON G.A., PROCTOR S.J., PEARSON J.E. & GUSTAFSON G.A. (1974). Diagnosis of duck virus enteritis (duck plague). 17th Annual Proceedings of American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Roanoke, Virginia, USA, 85–89.
9. GOUGH R.E. & ALEXANDER D.J. (1990). Duck virus enteritis in Great Britain, 1980 to 1989. *Vet. Rec.*, **126**, 595–597.
10. HANSEN W.R., BROWN S.E., NASHOLD S.W. & KNUDSON D.L. (1999). Identification of duck plague virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **43**, 106–115.
11. HANSEN W.R., NASHOLD S.W., DOCHERTY D., E., BROWN S.E. & KNUDSON D.L. (2000). Diagnosis of duck plague in waterfowl by polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **44**, 266–274.
12. ISLAM M.R., NESSA J. & HALDER K.M. (1993). Detection of duck plague virus antigen in tissues by immunoperoxidase staining. *Avian Pathol.*, **22**, 389–393.
13. KISARY S. & ZSAK L. (1983). Comparative studies on duck viral enteritis (DVE) virus strains in geese. *Avian Pathol.*, **12**, 395–408.
14. KOCAN R.M. (1976). Duck plague virus replication in Muscovy duck fibroblasts. *Avian Dis.*, **20**, 574–580.
15. PEARSON G.L. & CASSIDY D.R. (1997). Perspectives on the diagnosis, epizootiology and control of the 1973 duck plague epizootic in wild waterfowl at Lake Andes, South Dakota. *J. Wildl. Dis.*, **33**, 681–705.
16. PLUMMER P.J., ALEFANTIS T., KAPLAN S., O'CONNELL P., SHAWKY S. & SCHAT K.A. (1998). Detection of duck enteritis virus by polymerase reaction. *Avian Dis.*, **40**, 554–564.
17. PRITCHARD L.I., MORRISY C., VAN PHUC K., DANIELS P.W. & WESTBURY H.A. (1999). Development of a polymerase chain reaction to detect Vietnamese isolates of duck virus enteritis. *Vet. Microbiol.*, **68**, 149–156.
18. RICHTER J.H.M. & HORZINEK M.C. (1993). Duck Plague. *In: Virus Infections of Birds*, McFerran J.B. & McNulty M.S., eds. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, the Netherlands, 77–90.
19. RICHTER, J. H. M. & HORZINEK, M. C. (1993). DUCK PLAGUE. *In: J. B. McFERRAN & M. S. McNULTY (Eds.), VIRUS INFECTIONS OF BIRDS*, EDN PP. 77-90). AMSTERDAM, THE NETHERLANDS: ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.
20. SHAWKY S.A. & SANDHU T.S. (1997). Inactivated vaccine for protection against duck virus enteritis. *Avian Dis.*, **41**, 461–468.
21. SHAWKY S. & SCHAT K.A. (2002). Latency sites and reactivation of duck enteritis virus. *Avian Dis.*, **46**, 308–313.
22. THAYER G.S. & BEARD C.W. (1998). Serologic procedures. *In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, Fourth Edition, Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E. & Reed W.M., eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania, USA, 255–266.
23. WOLF K., BURKE C.N. & QUIMBY M.C. (1976). Duck viral enteritis: a comparison of replications by CCL-141 and primary cultures of duck embryo fibroblasts. *Avian Dis.*, **20**, 447–454.

*
* *

HÉPATITE VIRALE DU CANARD

RÉSUMÉ

L'hépatite du canard est due à au moins 3 virus dont le plus commun et le plus répandu est le virus de l'hépatite du canard (DHV pour Duck Hepatitis Virus) de type I, aujourd'hui considéré comme un picornavirus non classé, responsable d'une infection aiguë, létale des canetons de moins de 6 semaines d'âge et le plus souvent de moins de 3 semaines. Il n'infecte pas les autres oiseaux et cette maladie est dénommée généralement hépatite du canard.

Le virus de l'hépatite du canard de type II n'a été décrit qu'au Royaume-Uni. Chez des canards âgés de 10 jours à 6 semaines, le tableau clinique est similaire à celui de l'infection par le virus de type I. En microscopie électronique et par études moléculaires, il a été identifié comme étant un astrovirus.

Le virus de l'hépatite du canard de type III n'a été décrit qu'aux États-Unis d'Amérique. Il provoque des lésions hépatiques chez les canetons, mais est moins pathogène que le virus de type I. Il est considéré comme un picornavirus sans réaction sérologique croisée avec le virus de type I.

Le diagnostic de l'hépatite chez les canetons repose sur l'évolution de la maladie dans le troupeau, l'isolement du virus sur les canetons morts et la reproduction de la maladie chez des animaux sensibles.

Identification de l'agent pathogène : *il n'est pas possible de distinguer les virus de types I, II et III sur la base des tableaux clinique et lésionnel. En revanche, des différences existent quant à l'effet des virus isolés inoculés à des canetons, des œufs embryonnés et des cultures cellulaires. L'ARN du DHV de type I peut aussi être détecté par transcription réverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase à partir de foie de caneton ou d'œufs embryonnés de cane (liquides allantoïdes et foies des embryons).*

Épreuves sérologiques : *les épreuves sérologiques présentent peu d'intérêt pour le diagnostic des infections aiguës par les virus de types I, II et III.*

Des tests de séroneutralisation in ovo ou in vitro ont été mis au point pour le virus de type I et permettent l'identification du virus, l'évaluation des réponses vaccinales ainsi que la surveillance épidémiologique.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *des vaccins vivants atténués et un vaccin inactivé contre le virus de type I sont disponibles. Administrés aux reproducteurs, ils permettent de protéger les canetons en induisant une immunité. Les vaccins vivants atténués peuvent également être utilisés pour l'immunisation active des canetons de 1 jour.*

Les canetons peuvent aussi être protégés contre le virus de type I par administration d'anticorps vitellins de poulet.

Un vaccin vivant atténué contre le virus de l'hépatite du canard de type III est disponible pour administration aux reproducteurs et protection passive des canetons.

A. INTRODUCTION

L'hépatite du canard est due à au moins 3 virus différents, à savoir les virus de l'hépatite du canard (DHV pour *Duck hepatitis virus*) de types I, II et III. Le plus fréquent est le virus de type I, qui est considéré comme un picornavirus non classé et qui pourrait être attribué à un nouveau genre dans la famille des *Picornaviridae* (4, 10,

15). Le DHV de type II est un astrovirus et le DHV de type III est considéré comme un picornavirus sans relation sérologique avec le DHV de type I.

Un nouveau sérotype de DHV, dénommé N-DHV, a été décrit et provoque une forte mortalité avec des lésions hépatiques caractéristiques (16). Bien que proche du DHV de type I, le virus retrouvé sur les canetons mulards et les oisons est antigéniquement et phylogénétiquement différent.

Jusqu'à présent, le DHV type I n'a été associé qu'à une maladie chez les canetons colverts et de Pékin, mais il n'a jamais été signalé comme cause de pancréatite et d'encéphalite chez les canards de Barbarie (6).

Ces virus responsables d'infections aiguës doivent être différenciés du virus de l'hépatite B du canard, un hepadnavirus appartenant au même groupe que le virus de l'hépatite B de l'homme. L'importance de cette infection chez le canard reste à déterminer.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

a) Virus de l'hépatite du canard de type I

Le virus de l'hépatite du canard de type I est responsable d'une infection hautement contagieuse mais ne représente pas de danger pour la santé publique. La maladie affecte les canetons de moins de 6 semaines chez lesquels elle diffuse rapidement et entraîne une forte mortalité. Les symptômes cliniques sont de la léthargie et une ataxie. Les canetons vacillent, tombent et présentent des mouvements spasmodiques avant de mourir. Les cadavres sont fréquemment en opisthotonos. L'évolution clinique est rapide, durant parfois 1 à 2 h. La totalité du troupeau meurt en 3 à 4 jours, avec un pic de mortalité au 2^e jour. Les principales lésions macroscopiques sont une hépatomégalie associée à la présence d'hémorragies punctiformes et d'ecchymoses sur le foie. Une splénomégalie ainsi qu'une hypertrophie des reins associés à une congestion des vaisseaux sanguins rénaux peuvent également être observées. Les lésions microscopiques du foie sont caractérisées par une nécrose des hépatocytes et une hyperplasie des canaux biliaires associées à une réponse inflammatoire et des hémorragies d'importance variable.

Les observations cliniques et anatomopathologiques sont fortement indicatrices d'une infection par le virus de l'hépatite du caneton de type I. Il est possible d'isoler le virus à partir d'un homogénat de foie en tampon salin à 20 % (poids/vol.). La suspension est clarifiée, puis peut éventuellement être mise en présence de chloroforme à 5 % (vol./vol.) pendant 10 à 15 min à température ambiante puisque le virus est résistant à un tel traitement.

La présence du virus de l'hépatite du caneton de type I est généralement confirmée par l'une au moins des méthodes décrites ci-après :

- i) par inoculation par voie sous-cutanée ou intramusculaire à des canetons âgés de 1 à 7 jours sensibles à l'infection. La maladie typique est alors observée et les animaux meurent dans les 18 à 48 h suivant l'inoculation, souvent en moins de 24 h. Les canetons doivent présenter les lésions caractéristiques de la maladie et le virus doit pouvoir être ré-isolé à partir de leurs foies ;
- ii) par inoculation de dilutions sériées de l'homogénat de foie dans la cavité allantoïdienne d'œufs embryonnés de canard (âgés de 10 à 14 jours) ou de poulet (âgés de 8 à 10 jours). Les embryons de canard meurent en 24 à 72 h alors que l'effet sur les embryons de poulet est moins constant ; ceux-ci meurent généralement en 5 à 8 jours. Les lésions macroscopiques observables sur les embryons sont un retard de croissance et des hémorragies sous-cutanées sur l'ensemble du corps, avec un œdème marqué de l'abdomen et des pattes. Le foie des embryons peut être rouge et jaunâtre, hypertrophié et présenter des foyers de nécrose. Si les embryons ne meurent pas rapidement, la coloration verdâtre de l'allantoïde est plus prononcée et les lésions hépatiques ainsi que le retard de croissance sont plus nets ;
- iii) par inoculation à des cultures de cellules de première explantation de cellules hépatiques d'embryon de canard (cellules DEL) qui sont très sensibles à l'infection (17). L'homogénat de foie contenant le virus provoque un effet cytopathogène (ECP) caractérisé par l'apparition de cellules arrondies et nécrotiques. Lorsque le milieu de culture contient 1 % d'agarose (poids/vol.), l'ECP se traduit par la formation de plages de lyse de 1 mm de diamètre environ.

• Épreuves immunologiques

Ces épreuves ne sont pas utilisées en routine pour l'identification du virus de l'hépatite du canard de type I. Plusieurs tests de séroneutralisation ont été décrits, qui pourraient présenter un intérêt plus grand si les

infections par les virus de types II et III devenaient plus courantes. Les épreuves décrites (2, 17-19) sont les suivantes :

- i) des canetons âgés de 1 à 7 jours sensibles au virus de l'hépatite du canard de type I sont immunisés avec 1 à 2 ml de sérum hyperimmun spécifique ou d'anticorps vitellins spécifiques puis inoculés 24 h après par voie sous-cutanée ou intramusculaire avec au moins $10^{3,0}$ DL₅₀ (dose létale 50 %) d'isolat viral. Un groupe témoin de canetons non immunisés est infecté de la même façon. L'épreuve est positive si 80 à 100 % des canetons immunisés survivent alors que 80 à 100 % des témoins meurent.
- ii) des canetons âgés de 1 à 7 jours sensibles d'une part et présentant une immunité maternelle d'autre part sont infectés par voie sous-cutanée ou intramusculaire avec au moins $10^{3,0}$ DL₅₀ d'isolat viral. L'épreuve est positive si 80 à 100 % des canetons sous immunité maternelle survivent alors que 80 à 100 % des sensibles meurent.
- iii) des dilutions successives au 1/10 d'isolat viral sont mises en présence de volumes équivalents de sérum spécifique dilué entre 1/5 et 1/10. Les mélanges sont incubés à température ambiante pendant 1 h puis inoculés (0,2 ml) par voie sous-cutanée à des canetons sensibles ou dans la cavité allantoïdienne d'œufs embryonnés ou encore à des cellules hépatiques embryonnaires de canard. Dans tous les cas, les témoins sont constitués par des isolats viraux mélangés à des sérums témoins.

Il semble qu'il existe peu de variabilité antigénique entre les isolats de virus de l'hépatite du canard de type I. Néanmoins, un variant, le virus de type Ia isolé aux États-Unis d'Amérique ne réagit que partiellement avec un sérum dirigé contre le type I classique (12, 20). D'autres variants ont été signalés en Inde et en Égypte mais peu d'informations sont disponibles les concernant. La description en France d'une maladie des canards de Barbarie (6) et l'isolement du N-DHV au Taipei chinois (16), soulèvent de nouvelles questions quant à l'hépatite virale du canard.

- **Détection de l'acide nucléique**

Bien que plusieurs publications récentes aient décrit la structure moléculaire du DHV type I (4, 10, 15), une seule a décrit une transcription réverse suivie d'une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) en une étape pour la détection du DHV type I (9). Cette méthode est brièvement décrite ci-dessous.

- **La réaction d'amplification en chaîne par polymérase**

Cette méthode extraite de la référence 9 est basée sur des amorces qui amplifient spécifiquement une région du gène 3D.

- **Détection du DHV-I à partir d'organes d'embryons de canard et de poulet**

Les surnageants obtenus à partir de foie de canetons infectés avec le DHV-I sont récoltés et filtrés (0,2 µm). Une dose de 0,2 ml de ce surnageant est inoculée dans la cavité allantoïde de 5 œufs embryonnés de cane de 11 jours et 5 œufs embryonnés de poule de 9 jours. Les liquides allantoïdiens et les foies des embryons sont récoltés à partir des œufs inoculés avec deux souches de référence ; chaque prélèvement de foie est broyé et du tampon phosphate est ajouté pour obtenir des suspensions à 10 %. Les suspensions de foie et les liquides allantoïdiens sont centrifugés à 2 000 g pendant 30 min, puis les surnageants sont traités avec le kit d'extraction de l'ADN/ARN Viral Gene-spin™ et les acides nucléiques sont utilisés pour la RT-PCR en une étape.

- **Extraction de l'acide nucléique**

L'extraction de l'ARN viral est réalisée à l'aide du kit d'extraction Viral Gene-spin™ (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Corée du Sud). En résumé, 150 µl de l'échantillon est mélangé avec 250 µl d'un tampon de lyse. Pour une meilleure sensibilité de la RT-PCR, 50 µl d'eau distillée traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC) sont ajoutés à 100 µl de dilutions de 10 en 10 de l'échantillon de virus, avant d'être mélangés avec le tampon de lyse. Une fraction aliquote de 350 µl du tampon de liaison est ajoutée au mélange et triturée ; le volume total de 750 µl est placé sur une mini-colonne de centrifugation qui est centrifugée à 13 000 tr/min pendant 1 min à température ambiante. Le liquide qui a traversé la colonne est rejeté et deux centrifugations de lavage sont réalisées avec les tampons de lavage A et B (500 µl) suivies par une dernière centrifugation pendant 1 min sur une membrane sèche. La colonne est transférée sur un nouveau tube de collecte de 1,5 ml et l'ARN est élué par addition de 40 µl de tampon d'éluion pendant 1 min à 13 000 tr/min.

Les échantillons sont conservés à -20 °C après que la concentration en ARN ait été mesurée en utilisant le NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE).

- **RT-PCR en une étape**

La RT-PCR en une étape est réalisée en utilisant le kit Maxime RT-PCR PreMix (iNtRON Biotechnology). Les mélanges de réaction (20 µl) contiennent 1 U de réverse transcriptase (OptiScript reverse

transcriptase), 2,5 mM de dNTPs, 2,5 U de i-StarTaq DNA polymerase, et du tampon pour RT-PCR (50 mM de Tris/HCl et 75 mM de KCl). En outre, les réactifs suivants sont inclus dans la réaction : 4 µl (50 ng) de la matrice ARN ou ADN, 1 µl (10 pmol/µl) de chacune des amorces spécifiques (DHV-1 ComF et DHV-1 ComR), et de l'eau distillée traitée au DEPC pour un volume de réaction final de 20 µl.

Un thermo-cycleur T-gradient (Biometra, Gottingen, Allemagne) est utilisé pour la RT-PCR en une étape. La transcription reverse est réalisée à 45 °C pendant 30 min, après quoi l'enzyme est inactivée à 94 °C pendant 5 min. L'amplification est menée en commençant par une étape de dénaturation de 20 s à 94 °C, suivie par 40 cycles de recuit à 52 °C pendant 30 s, d'extension à 72 °C pendant 30 s et de dénaturation à 94 °C pendant 20 s, puis d'une étape finale d'extension à 72 °C pendant 5 min. Les produits de réactions sont conservés à 4 °C.

- **Détection des produits de la RT-PCR en une étape**

Les produits de la PCR (10 µl) sont séparés par électrophorèse (100 V) sur gel d'agarose à 1,5 % (iNtRON Biotechnology) avec du tampon Tris-acétate (40 mM Tris-acétate, 1 mM acide éthylènediamine-tétra-acétique). Les gels sont colorés au bromure d'éthidium (0,5 µg/ml), visualisés sous lumière ultra-violette et photographiés.

- **Interprétation des résultats**

La RT-PCR en une étape amplifie un fragment de 467 pb, si l'ARN est extrait de foies de canetons infectés avec les souches de référence du DHV-I. L'ARN négatif témoin est obtenu à partir du foie de canetons non infectés et, dans les mêmes conditions, aucune amplification n'a lieu.

b) **Virus de l'hépatite du canard de type II**

L'infection de canards par le virus de type II n'a été rapportée qu'au Royaume-Uni (1, 5). Il s'agit d'une maladie aiguë mortelle des canetons dont l'expression clinique ainsi que les lésions sont similaires à celles liées au virus de type I. Les oiseaux malades présentent de la polydypsie et meurent en 1 à 2 jours après l'apparition des symptômes.

Les lésions macroscopiques consistent en des hémorragies multiples à la fois punctiformes et sous forme de bandes confluentes sur le foie, des reins hypertrophiés et pâles et leurs vaisseaux congestifs ainsi qu'en une splénomégalie. Le tube digestif est souvent vide et l'intestin contient du mucus, avec parfois des zones hémorragiques. À l'examen histologique, les lésions du foie sont semblables à celles observées en cas d'infection par le virus de type I ; l'hyperplasie des canaux biliaires peut être plus importante, même si cela est inconstant. Le DHV II présente une forme semblable à celle des astrovirus et les particules virales ont un diamètre de 28 à 30 nm. Il est classé dans la famille des *Astroviridae* comme l'astrovirus I du canard (DAstV-I) (5, 11).

Il est possible d'isoler le virus en réalisant un homogénat de foie à 20 % (poids/vol.) en tampon salin, suspension qui peut être utilisée pour inoculer :

- des canetons sensibles chez lesquels l'effet est variable. Il est possible d'observer une mortalité de 20 % sur 2 à 4 jours avec un tableau nécropsique comparable à celui observé en cas d'infection naturelle (5). Ceci diffère des observations réalisées avec le virus de type I qui est plus pathogène et dont les effets sur les animaux sont plus rapides.
- des œufs embryonnés de poulet ou de canard, dans la cavité amniotique ou le sac vitellin. Un effet peut être ponctuellement observé après 4 passages sans mortalité lors des passages antérieurs. Les embryons présentent de signes d'infection (nanisme et foies nécrosés et verdâtres) 6 à 10 jours après infection.

- **Épreuves immunologiques**

Les épreuves immunologiques ne sont pas utilisées en routine car la réponse sérologique à l'infection chez les canetons et chez les embryons est faible. Néanmoins, un test de séroneutralisation a été utilisé (5) pour l'identification du virus en inoculant des embryons de poulet dans la cavité amniotique selon une méthode à sérum constant et virus variable.

Des épreuves de protection croisée peuvent être réalisées sur des canetons de 2 à 4 jours (5) auxquels on administre des sérums dirigés contre le virus de type I ou II puis infectés 3 jours plus tard avec l'isolat viral. Cette méthode peut permettre de distinguer le virus de type II des types I et III.

c) Virus de l'hépatite du canard de type III

Le virus de type III a été décrit aux États-Unis uniquement. Chez les canetons immunisés vis-à-vis du virus de type I la mortalité est inférieure ou égale à 20 % (7, 13). Le virus de type III provoque des signes cliniques similaires à ceux observés en cas d'infection par le type I.

Les lésions sont également semblables à celles dues au virus de type I. La surface du foie est pâle et marbrée avec des bandes congestives et des pétéchies. La rate est décolorée, sans hypertrophie notable et les reins peuvent présenter des plaques congestives.

Le virus peut être isolé à partir d'un homogénat de foie et résiste à un traitement à base de chloroforme à 5 %. Il est possible d'isoler le virus par les méthodes ci-après :

- i) par inoculation à des canetons sensibles par voie intramusculaire. Le taux de mortalité peut atteindre 20 % avec 60 % de morbidité. Aucune mort n'est observée pendant les premières 24 h et les morts surviennent entre 2 et 4 jours après inoculation. L'inoculation par voie intraveineuse est plus efficace ; le virus de type III est moins virulent que le virus de type I.
- ii) par inoculation sur la membrane chorio-allantoïdienne d'œufs embryonnés de canard âgés de 10 jours. La réponse est irrégulière, mais de façon systématique on observe une mortalité d'embryons en 7 à 10 jours. Les membranes présentent un aspect sec et croûteux sous lequel elles sont oedémateuses. Les embryons peuvent être nanifiés et oedémateux et présenter des hémorragies cutanées. Le foie, les reins et la rate sont hypertrophiés.

Les essais de culture du virus sur œufs de poulet se sont avérés infructueux.

Le virus ne provoque pas d'ECP sur les cellules en culture, mais il peut être mis en évidence par immunofluorescence directe dans des cultures de cellules hépatiques (cellules DEL) ou rénales d'embryons (cellules DEK) infectées expérimentalement (7).

2. Épreuves sérologiques

Elles ne sont pas utilisées pour le diagnostic car l'évolution de l'infection est trop rapide.

Des tests de séroneutralisation *in ovo* ont été mis au point pour les 3 types de virus, avec certaines difficultés de réplication du virus, notamment pour les virus de types II et III. Concernant le virus de type I, des épreuves *in vitro* de réduction des plages de lyse et un test en microplaque existent (17, 18). La méthode de réduction des plages de lyse est réalisée sur cellules embryonnaires de foie ou de reins. Les cultures en monocouche de cellules de première explantation sont cultivées en milieu MEM (*Eagle's minimal essential medium*) supplémenté avec 5 à 10 % de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine, 0,17 % de bicarbonate de sodium et de la gentamicine. Après trypsination, les cellules sont ensemencées dans des boîtes de Petri de 5 cm de diamètre et incubées à 37 °C sous CO₂. Les tapis cellulaires doivent être confluent en 24 à 48 h. Les cellules sont lavées 2 fois en milieu sans sérum ou en solution tamponnée de Hank afin d'éliminer le sérum avant d'infecter les cellules avec le virus de l'hépatite du canard de type I. Du virus en milieu sans sérum à 200 UFP (unités formant plaque) dans 0,1 ml est mis au contact de dilutions sériées au demi de sérum de canard en milieu MEM. Les échantillons de sérum sont au préalable inactivés par incubation à 56 °C pendant 30 min. Les mélanges virus/sérum sont incubés pendant 1 h à 37 °C puis 0,1 ml de mélange sont mis au contact de cellules confluentes, chaque dilution étant testée en triple. Après 30 min d'incubation à température ambiante (entre 20 et 22 °C), les cellules sont recouvertes d'un milieu d'entretien avec agarose (milieu MEM supplémenté avec 2 % de sérum de poulet, et 0,1 à 0,2 % de sérum de veau fœtal et auquel de l'agarose a été ajouté pour obtenir une concentration finale de 1 % [poids/poids]). Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C en atmosphère enrichie en CO₂ à 5 %. Le nombre de plages de lyse générées est évalué après 48 h d'incubation. Les plages de lyse sont observées en éclairage oblique ou en fixant les tapis cellulaires avec un tampon à 10 % de formol et colorés avec du cristal violet à 1 %. Le titre des sérums est égal à l'inverse de la dilution pour laquelle 50 % des plages de lyse ont disparu.

Un test de séroneutralisation en microplaques sur cellules rénales d'embryon de canard est possible. Des dilutions sériées au demi des sérums préalablement inactivés par chauffage sont placés dans un volume de 50 µl de milieu BME (*Eagle's basal medium*) dans des microplaques de 96 puits. A chaque puits est ajouté 10^{2,0} DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) de virus de l'hépatite du canard de type I dans 50 µl de milieu BME et les plaques sont incubées pendant 1 h à 37 °C. Une suspension de cellules rénales d'embryon de canard en milieu BME supplémenté avec 10 % de bouillon tryptose phosphate, 2 mM de L-glutamine, 0,17 % de bicarbonate de sodium et 2 à 4 % de sérum de poulet est ajustée à la concentration de 3 × 10⁵ cellules/ml. Les cellules sont ensuite ajoutées dans les plaques à raison de 100 µl de suspension cellulaire par puits et les plaques sont incubées pendant 96 h à 37 °C en atmosphère humide enrichie en CO₂ à 5 %. Après incubation, les cellules sont fixées avec un tampon salin contenant 10 % de formol puis colorées avec du cristal violet à 1 %. Après observation des plaques, le titre des sérums est égal à l'inverse de la dilution la plus élevée pour laquelle la

culture cellulaire est intacte (absence d'ECP), indiquant une totale neutralisation du sérum. Un titre inférieur à $4 \log_2$ est considéré comme négatif.

Ces tests de séroneutralisation peuvent être utilisés pour évaluer la réponse immunitaire humorale après vaccination, ainsi que dans le cadre d'études épidémiologiques ou pour l'identification du virus.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Un vaccin vivant atténué contre le virus de l'hépatite du canard de type I est disponible. Administré aux reproducteurs, il permet de transférer une immunité passive aux canetons. Il est également possible de vacciner les canetons après l'éclosion (3). Un vaccin inactivé est également disponible qui permet un transfert passif de l'immunité après administration à des reproducteurs préalablement immunisés avec le vaccin vivant ou exposés à une souche sauvage (18). Il est encore possible de conférer une immunité passive aux canetons en leur administrant des anticorps vitellins de poulet.

Un vaccin vivant atténué contre le virus de l'hépatite du canard de type II a été utilisé en conditions expérimentales (5).

Il est possible de protéger contre le virus de l'hépatite du canard de type III avec un vaccin vivant administré aux reproducteurs et transfert passif de l'immunité aux canetons.

Les lignes directrices pour la production des vaccins vétérinaires sont décrites dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices énoncées ci-après ainsi que dans le Chapitre 1.1.8. se veulent générales et peuvent être complétées par des recommandations nationales ou régionales.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Le lot de semence primaire du vaccin contre le virus de type I le plus fréquemment utilisé en Europe provient d'un isolat cultivé 53 à 55 fois sur œuf embryonné de poulet. Aux États-Unis, il a subi 84 à 89 passages.

Le vaccin contre le virus de type II provient d'une souche atténuée suite à 25 passages sur œuf embryonné de poulet (1) et n'a été utilisé que dans le cadre d'essais cliniques (R.E. Gough, communication personnelle).

Le lot de semence primaire du vaccin contre le virus de type III a été atténué par 30 passages sur œuf embryonné de canard après inoculation sur la membrane chorio-allantoïdienne.

b) Méthode de culture

Le lot de semence primaire des vaccins contre les virus de type I et II sont manipulés de façon similaire. Ils doivent être cultivés sur des œufs embryonnés de poulet EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiques) de 9 à 10 jours inoculés par voie allantoïdienne et incubés à 37 °C. Ils peuvent être conservés sous forme d'homogénats en tampon salin à une température ≤ -70 °C pendant plusieurs années.

Le lot de semence primaire des vaccins contre les virus de type I et III doit être cultivé sur œufs embryonnés de canard EOPS de 10 jours inoculés sur la membrane chorio-allantoïdienne et incubés pendant 6 à 10 jours à 37 °C. Ils peuvent être conservés sous forme d'homogénats de membrane chorio-allantoïdienne à une température ≤ -70 °C.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Les lots de semence primaire doivent être exempts de virus exogènes pathogènes pour les canards, les poulets ou les dindes, ainsi que de toute contamination bactérienne ou fongique.

Chez les canetons à l'éclosion, le vaccin contre le virus de type I se multiplie rapidement et entraîne l'apparition d'une immunité dans les 48 à 72 h qui suivent la vaccination, immunité qui persiste pendant toute la période de sensibilité à l'infection (3). Chez les canetons protégés par transfert passif de l'immunité des reproducteurs, celle-ci décroît au cours des deux premières semaines de vie et les canetons peuvent être re-vaccinés avec un vaccin vivant par voie orale ou sous-cutanée vers 7 à 10 jours d'âge (8, 14). Une

immunité peut également être conférée aux canetons par administration d'anticorps vitellins obtenus à partir d'œufs de poules hyperimmunisées contre le virus de l'hépatite du canard de type I.

Le protocole consistant à primovacciner les canes reproductrices avec un vaccin vivant puis leur injecter un vaccin inactivé par voie intramusculaire permet de protéger les canetons issus de ces canes pendant toute la durée de la saison de ponte (18).

2. Méthode de fabrication

Les vaccins contre les virus de type I et II sont obtenus de façon comparable. Le vaccin est produit sur œufs embryonnés de poulet EOPS âgés de 9 à 10 jours inoculés dans la cavité allantoïdienne et incubés à 37 °C. La plupart des embryons meurent après 2 ou 3 jours (virus de type I) et 6 à 10 jours (virus de type II). Afin de maximiser la production de virus, les embryons sont prélevés après 3 à 5 jours d'incubation. Un homogénat en tampon salin est réalisé et clarifié par centrifugation à faible vitesse puis dilué et réparti en tubes qui sont congelés rapidement à une température ≤ -70 °C. Par la suite, ils peuvent être conservés entre -20 °C et -40 °C. Le vaccin contre le virus de type I existe également sous forme lyophilisée qui peut être conservée entre 2 et 8 °C. Le vaccin reconstitué est utilisé avec ou sans ajout d'hydroxyde d'aluminium dans le diluant.

Pour la préparation du vaccin inactivé contre le virus de type I, l'homogénat d'embryons est clarifié par centrifugation à faible vitesse puis purifié par un traitement au chloroforme à une concentration finale de 10 % (vol./vol.) et inactivé à l'aide d'éthylène-imine binaire préparée extemporanément. Le virus inactivé est mélangé avec un adjuvant (du LES-STM¹) et un agent de conservation (du formol à 0,2 % vol./vol.) (18).

Le vaccin contre le virus de type III est cultivé sur œufs embryonnés de canard EOPS âgés de 10 jours inoculés sur la membrane chorio-allantoïdienne et incubés à 37 °C. La plupart des embryons meurent en 6 à 10 jours. Un homogénat en tampon salin est constitué à partir des embryons et des membranes chorio-allantoïdiennes et clarifié par centrifugation à faible vitesse puis dilué et réparti en tubes qui sont congelés rapidement à une température ≤ -70 °C.

• Anticorps vitellins

Du virus de type I obtenu à partir de foies de canetons ou du virus atténué peuvent être utilisés pour produire des anticorps vitellins sur œufs de poules EOPS. Les œufs des poules hyperimmunisées sont stockés à 4 °C puis les vitellus sont prélevés, mélangés et additionnés d'un agent anti-émulsion. Le mélange est dilué en tampon salin contenant au maximum 0,2 % (vol./vol.) de formol comme agent de conservation. Le produit final testé pour l'absence de contaminants est stocké à 4 °C et a une durée d'utilisation de 1 an.

3. Contrôles en cours de fabrication

Tout cas de mortalité d'embryon dans les 24 h suivant l'inoculation doit être considéré comme non spécifique et l'embryon éliminé.

L'identification du virus doit être réalisée par une méthode de séroneutralisation à virus variable et sérum constant. Ces tests sont à réaliser sur œufs embryonnés de poulet pour les types I et II et de canard pour le type III. Le sérum spécifique doit entraîner une diminution du titre viral d'au minimum $10^{2,0}$ DLE₅₀ (Dose létale pour 50 % des embryons).

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests permettant d'évaluer la stérilité et l'absence de contamination sont décrits dans le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Des canetons de 1 à 3 jours d'âge sensibles aux virus doivent être inoculés par voie sous-cutanée ou intramusculaire (virus de types I et II) ou sous-cutanée (virus de type III) avec le vaccin atténué à 10 fois la dose recommandée puis observés pendant 10 à 21 jours pour la mise en évidence d'éventuels effets secondaires. Les vaccins vivants atténués doivent être stables et ne pas redevenir virulents lors de passage sur canetons sensibles.

1 Une préparation de *Salmonella typhimurium* (STM), un mitogène B, en émulsion lipidique (LES). Fourni par Ribi Immunochem Research, Hamilton, Montana 59840, États-Unis d'Amérique.

Pour tester l'innocuité du vaccin inactivé contre le virus de type I, des canetons de 1 jour sont vaccinés par voie intramusculaire à la dose recommandée (0,5 ml) et ne doivent pas présenter de réactions vaccinales pendant la période d'observation.

Dans le cas des anticorps vitellins, des canetons reçoivent 1 ml d'anticorps par voie sous-cutanée puis sont observés pendant 3 jours.

c) Activité

Pour les vaccins contre les virus de types I et II, le titre viral du vaccin est déterminé sur des œufs embryonnés de poulet âgés de 9 à 10 jours après inoculation dans la cavité allantoïdienne et incubation à 37 °C. L'immunité conférée par le vaccin est évaluée en vaccinant des canetons sensibles par voie sous-cutanée avec au minimum $10^{3,3}$ DLE₅₀ par caneton, puis en les infectant 72 h plus tard avec $10^{3,0}$ DL₅₀ de virus sauvage (3). Le taux de survie chez les vaccinés doit être supérieur à 80 % alors que le taux de mortalité chez les témoins doit être de 80 % pour le type I et 20 % pour le type II.

Le vaccin inactivé confère une immunité suffisante si le titre en anticorps neutralisants est au moins multiplié par quatre après vaccination de canetons préalablement immunisés avec le vaccin à virus vivant de type I.

Le titre du vaccin contre le virus de type III doit être déterminé sur œufs embryonnés de canard âgés de 10 jours inoculés sur la membrane chorio-allantoïdienne. Le pouvoir immunogène du vaccin est difficile à évaluer par une épreuve sur canards en raison de la variabilité du pouvoir pathogène du virus utilisé pour l'épreuve.

Concernant les anticorps vitellins, l'activité peut être évaluée en déterminant l'index de séroneutralisation sur œufs embryonnés de poulet par une méthode à vitellus constant et virus variable. Un index de neutralisation supérieur ou égal à $10^{3,0}$ est considéré comme correct. L'efficacité du produit est déterminée en administrant à des canetons la dose recommandée d'anticorps vitellins alors qu'un groupe témoin ne reçoit pas d'anticorps. Après 24 h, chaque groupe est éprouvé avec du virus de l'hépatite du canard de type I. Les anticorps vitellins sont considérés comme efficaces si au moins 80 % des canetons traités survivent alors que 80 % des témoins meurent.

d) Durée de l'immunité

La vaccination des canes reproductrices selon les protocoles suivants permet l'immunisation passive des canetons pendant la totalité de la saison de ponte : (i) deux ou trois administrations de vaccin vivant atténué contre le virus de type I à 12, 8 et 4 semaines avant l'entrée en ponte ou (ii) deux vaccinations avec le vaccin inactivé contre le virus de type III à 12 et 4 semaines avant l'entrée en ponte. Il est toutefois recommandé de revacciner par la suite tous les 3 mois avec le vaccin contre le virus de type I et tous les 6 mois avec le vaccin contre le virus de type III. Le vaccin contre le virus de type I est également disponible sous forme lyophilisée à mélanger avec un diluant contenant de l'hydroxyde d'aluminium et peut être administré à 7 semaines d'âge, puis 2 semaines avant l'entrée en ponte. Ce protocole doit permettre de protéger les canetons pendant toute la période de ponte. Il n'existe pas de données concernant l'utilisation du vaccin contre le virus de type II chez les canes reproductrices.

L'administration de vaccin vivant contre les virus de types I et II aux canetons de 1 jour par voie sous-cutanée ou intramusculaire permet de les protéger pendant leur période de sensibilité. Aucune information n'est disponible concernant l'utilisation d'un vaccin contre le virus de type III chez les canetons de 1 jour.

La primovaccination de canes reproductrices avec un vaccin vivant contre le virus de type I puis l'administration du vaccin inactivé en une injection intramusculaire de rappel devraient permettre de protéger les canetons pendant toute la période de ponte (18).

Les anticorps vitellins confèrent une immunité passive efficace en cas d'épisode mais la durée de l'immunité conférée est de courte durée.

e) Stabilité

Les vaccins vivants contre les virus de types I, II et III sont stables pendant au moins 1 an à -70 °C. Après décongélation, ils doivent être conservés à 4 °C et utilisés dans la semaine. Les vaccins vivants lyophilisés sont stockés entre 2 et 8 °C et conservent leur activité pendant au moins 1 an.

Le vaccin inactivé contre le virus de type I est adjuvé et peut être stocké à 4 °C pendant au moins 20 mois sans perte d'efficacité.

Les anticorps vitellins peuvent être stockés pendant 1 an à 4 °C.

f) Agents de conservation

Les vaccins vivants contre les virus de types I, II et III ne contiennent pas d'agents de conservation.

Le vaccin inactivé contre le virus de type I et les anticorps vitellins contiennent du formol (jusqu'à 0,2 % vol./vol.).

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Le vaccin inactivé contre le virus de type I doit être correctement remis en suspension avant emploi.

5. Contrôles du produit fini

Les vaccins vivants atténués contre les virus de types I et III sont disponibles sous forme de flacons de vaccin concentré congelé ou lyophilisé et de flacons de diluant stérile sur lequel des tests de stérilité ont été réalisés (voir Chapitre C.4.a). Le vaccin vivant contre le virus de type II n'a été mis au point qu'expérimentalement.

a) Innocuité

Aucun test supplémentaire ne doit être réalisé après les contrôles de lots.

b) Activité

Aucun test supplémentaire ne doit être réalisé après les contrôles de lots.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ASPLIN F.D. (1965). Duck hepatitis. Vaccination against two serological types. *Vet. Rec.*, **77**, 1529–1530.
2. CHALMERS W.S.K. & WOOLCOCK P.R. (1984). The effect of animal sera on duck hepatitis virus. *Avian Pathol.*, **13**, 727–732.
3. CRIGHTON G.W. & WOOLCOCK P.R. (1978). Active immunisation of ducklings against duck virus hepatitis. *Vet. Rec.*, **102**, 358–361.
4. DING C. & ZHANG D. (2007). Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1. *Virology*, **361**, 9–17.
5. GOUGH R.E., BORLAND E.D., KEYMER I.F. & STUART J.C. (1985). An outbreak of duck hepatitis type II in commercial ducks. *Avian Pathol.*, **14**, 227–236.
6. GUÉRIN J.-L., ALBARIC O., NOUTARY V. & BOISSIEU C. (2007). A duck hepatitis virus type I is agent of pancreatitis and encephalitis in Muscovy duckling. *In: Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Avian Pathologists*, 14–18 July 2007, Washington, DC, USA.
7. HAIDER S.A. & CALNEK B.W. (1979). *In-vitro* isolation, propagation and characterisation of duck hepatitis virus type III. *Avian Dis.*, **23**, 715–729.
8. HANSON L.E. & TRIPATHY D.N. (1976). Oral immunisation of ducklings with an attenuated hepatitis virus. *Dev. Biol. Stand.*, **33**, 357–363.
9. KIM M.C., KWON Y.K., JOH S.J., KWON J.H., KIM J.H. & KIM S.J. (2007). Development of one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect duck hepatitis virus type 1. *Avian Dis.*, **51**, 540–545.
10. KIM M.C., KWON Y.K., JOH S.J., LINDBERG A.M., KWON J.H., KIM J.H. & KIM S.J. (2006). Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus *Parechovirus* in the family *Picornaviridae*. *J. Gen. Virol.*, **87**, 3307–3316.
11. KOCI M.D. & SCHULTZ-CHERRY S. (2002). Avian astroviruses. *Avian Pathol.*, **31**, 213–227.
12. SANDHU T.S., CALNEK B.W. & ZEMAN L. (1992). Pathologic and serologic characterisation of a variant of duck hepatitis type I virus. *Avian Dis.*, **36**, 932–936.
13. TOTH T.E. (1969). Studies of an agent causing mortality among ducklings immune to duck virus hepatitis. *Avian Dis.*, **13**, 834–846.

14. TRIPATHY D.N. & HANSON L.E. (1986). Impact of oral immunisation against duck viral hepatitis in passively immune ducklings. *Prev. Vet. Med.*, **4**, 355–360.
15. TSENG C.H., KNOWLES N.J. & TSAI H.J. (2007). Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus. *Virus Res.*, **123**, 190–203.
16. TSENG C.H. & TSAI H.J. (2007). Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus. *Virus Res.*, **126**, 19–31.
17. WOOLCOCK P.R. (1986). An assay for duck hepatitis virus type I in duck embryo liver cells and a comparison with other assays. *Avian Pathol.*, **15**, 75–82.
18. WOOLCOCK P.R. (1991). Duck hepatitis virus type I: Studies with inactivated vaccines in breeder ducks. *Avian Pathol.*, **20**, 509–522.
19. WOOLCOCK P.R. (1998). Duck virus hepatitis. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fourth Edition, Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E. & Reed W.M., eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania, USA, 200–204.
20. WOOLCOCK P.R. (2003). Duck hepatitis. In: S.Y.M., Diseases of Poultry, Eleventh Edition, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D.E., eds. Iowa State Press, Iowa, USA, 343–354.

*
* *

CHAPITRE 2.3.9.

CHOLÉRA AVIAIRE

RÉSUMÉ

Le choléra aviaire (pasteurellose aviaire) est une affection aviaire fréquente qui peut toucher tous les types d'oiseaux et qui présente une répartition mondiale. Les foyers de choléra aviaire se manifestent souvent par une septicémie aiguë fatale. Le diagnostic dépend de l'isolement et de l'identification de la bactérie responsable, Pasteurella multocida. Le diagnostic de suspicion peut être basé sur l'apparition de symptômes et de lésions caractéristiques et/ou sur l'observation au microscope de très nombreuses bactéries sur un étalement sanguin ou calque tissulaire comme le foie ou la rate. Des formes atténuées ou chroniques de la maladie peuvent aussi être notées quand celle-ci est enzootique avec des infections localisées principalement au niveau des systèmes respiratoire et squelettique.

Identification de l'agent pathogène : Pasteurella multocida est facilement isolée, souvent en culture pure, à partir des organes viscéraux comme le poumon, le foie et la rate, la moelle osseuse, les gonades ou le sang cardiaque des oiseaux ayant succombé à une forme aiguë de la maladie avec bactériémie ou de l'exsudat caséux caractéristique observé dans les lésions du choléra aviaire chronique. Il s'agit d'une bactérie anaérobie facultative qui pousse de préférence à 37 °C. L'isolement primaire est obtenu avec des milieux tels que la gélose amidon-dextrose, la gélose au sang et la gélose trypticase-soja. L'isolement peut être amélioré par l'addition de 5 % de sérum chauffé inactivé. Le diamètre des colonies varie de 1 à 3 mm après 18 à 24 h d'incubation et elles sont discrètes, arrondies, convexes et translucides. Les cellules sont coccobacillaires ou en forme de court bâtonnet, de taille comprise entre 0,2-0,4 × 0,6-2,5 µm, Gram négatives, et se présentant en général isolées ou par paires. Une coloration bipolaire est évidente avec les colorations de Wright ou de Giemsa.

L'identification de P. multocida est basée sur les résultats des tests biochimiques, dont la fermentation des glucides, la production d'enzymes, et la production de certains métabolites.

La caractérisation sérologique des souches de P. multocida comprend l'identification du sérotype capsulaire et celui du sérotype somatique. L'empreinte génétique de l'ADN peut différencier les P. multocida présentant le même sérotype capsulaire et sérotype somatique. Ces caractérisations nécessitent un laboratoire spécialisé avec des réactifs appropriés pour ce diagnostic.

Épreuves sérologiques : les tests sérologiques sont rarement utilisés pour le diagnostic du choléra aviaire. La facilité avec laquelle on obtient un diagnostic définitif avec l'isolement et l'identification de l'organisme exclut la nécessité d'un diagnostic sérologique.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : les vaccins contre P. multocida utilisent en général des bactéries inactivées, avec de l'hydroxyde d'aluminium ou de l'huile comme adjuvant, préparées à partir de multiples sérotypes. Deux doses de vaccin à bactéries inactivées sont habituellement recommandées. Des vaccins obtenus à partir de cultures vivantes ont tendance à transmettre une immunité protectrice supérieure, mais sont moins utilisés du fait des séquelles post-vaccinales potentielles comme une pneumonie ou une arthrite. Les vaccins multivalents comprennent habituellement les sérotypes somatiques 1, 3 et 4 car il s'agit des sérotypes aviaires les plus souvent isolés. Les tests d'innocuité et d'activité des vaccins à bactéries inactivées utilisent habituellement l'animal hôte. L'activité de la récolte finale des cultures vivantes est testée par un comptage des bactéries.

A. INTRODUCTION

Le choléra aviaire est une maladie bactérienne contagieuse des espèces aviaires domestiques et sauvages due à l'infection par *Pasteurella multocida*. Elle survient habituellement sous une forme suraiguë fulminante avec une bactériémie massive et des taux importants de morbidité et de mortalité. Des infections chroniques peuvent aussi survenir avec des symptômes et des lésions liés à des infections localisées. L'appareil pulmonaire ainsi que le système musculo-squelettique sont souvent le siège de ces infections. Les synonymes les plus courants pour le choléra aviaire sont la pasteurellose aviaire et la septicémie aviaire hémorragique. Le choléra aviaire n'est pas considéré comme une zoonose potentielle car les isolats aviaires sont généralement non pathogènes pour les mammifères exposés par voies orale ou sous-cutanée. D'autres maladies bactériennes, dont les salmonelloses, la colibacillose et la listériose de la poule ainsi que la pseudotuberculose, le rouget et la chlamydophilose du dindon peuvent présenter des symptômes et des lésions similaires au choléra aviaire. La différenciation se fait par l'isolement et l'identification de *P. multocida* qui est facile à cultiver dans les cas de choléra aviaire.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Le choléra aviaire (pasteurellose aviaire) est une maladie aviaire commune qui peut affecter tous les types d'oiseaux et qui est souvent fatale (3, 7). Dans la forme suraiguë, le choléra aviaire est l'une des maladies les plus virulentes et les plus contagieuses des volailles. Le diagnostic dépend de l'identification de la bactérie responsable *P. multocida*, après son isolement à partir d'oiseaux ayant présenté des symptômes et des lésions caractéristiques de cette affection. Le diagnostic de suspicion peut être basé sur l'observation des symptômes et des lésions caractéristiques et/ou par la mise en évidence de la bactérie à l'examen microscopique montrant une coloration bipolaire à partir d'étalement sanguin ou de calques tissulaires comme le foie ou la rate. Des formes atténuées de la maladie peuvent être observées.

Toutes les espèces aviaires sont sensibles à *P. multocida*, bien que les dindons puissent être les plus sévèrement touchés. Souvent le premier signe de la présence de la maladie est la découverte d'oiseaux morts. Les symptômes suivants peuvent également être observés : hyperthermie, anorexie, apathie, jetage muqueux par la bouche, diarrhée, plumes ébouriffées, chute du taux de ponte avec production d'œufs plus petits, augmentation de la fréquence respiratoire et cyanose au moment de la mort. Les lésions souvent observées sont : des organes congestionnés avec des hémorragies sur les séreuses, une hépatomégalie et une splénomégalie, de multiples petits foyers de nécrose sur le foie et/ou sur la rate, une pneumonie, une ascite légère et un œdème péricardique. Les oiseaux survivant à cette forme aiguë septicémique ou infectés par des organismes de moindre virulence peuvent développer un choléra aviaire chronique caractérisé par des infections localisées. Ces infections concernent le plus souvent les articulations, les faces plantaires, les gaines tendineuses, la bourse sternale, la conjonctive, les barbillons, le pharynx, les poumons, les sacs aériens, l'oreille moyenne, la moelle osseuse et les méninges. Les lésions résultant de ces infections sont habituellement caractérisées par une colonisation bactérienne avec nécrose, un exsudat fibrino-purulent et une fibroplasie à des degrés divers.

Le diagnostic dépend de l'isolement et de l'identification de l'organisme responsable.

1. Identification de l'agent pathogène

Pasteurella multocida est une bactérie anaérobie facultative qui pousse de préférence à 37 °C. L'isolement primaire est obtenu avec des milieux tels que la gélose amidon-dextrose, la gélose au sang et la gélose trypticase-soja. L'isolement peut être amélioré par l'addition de 5 % de sérum chauffé inactivé. Le milieu de maintenance ne nécessite pas de sérum supplémentaire. Le diamètre des colonies varie de 1 à 3 mm après 18 à 24 h d'incubation et elles sont discrètes, arrondies, convexes et translucides. Les organismes encapsulés produisent généralement des colonies plus importantes que les organismes non encapsulés. Les colonies mucoïdes aqueuses, souvent observées dans les isolats venant du tractus respiratoire des mammifères, sont très rares dans les isolats aviaires. Les cellules sont coccobacillaires ou en forme de court bâtonnet, de taille comprise entre 0,2-0,4 × 0,6-2,5 µm, Gram négatives, et se présentant en général seules ou par paires. Les organismes isolés récemment ou observés dans les calques tissulaires montrent une coloration bipolaire avec les colorations de Wright ou de Giemsa ou encore avec le bleu de méthylène et sont habituellement encapsulés.

L'isolement de l'organisme est facile à obtenir à partir des organes viscéraux tels que le foie, la moelle osseuse, la rate ou le sang cardiaque des oiseaux succombant à la maladie aiguë ou à partir des lésions exsudatives des oiseaux atteints par la forme chronique de la maladie. L'isolement à partir de ces cas chroniques ne présentant pas d'autres signes cliniques qu'un amaigrissement et une apathie est souvent difficile. Dans ces conditions où lorsque la décomposition de l'oiseau est commencée, la moelle osseuse devient le tissu de choix pour les tentatives d'isolement. La surface du tissu à cultiver est cautérisée avec une spatule chauffée et un échantillon est prélevé par l'insertion d'un écouvillon avec du coton stérile, d'une anse métallique ou en matière plastique à travers la surface stérilisée par la chaleur. Le prélèvement est inoculé directement sur un milieu gélosé ou dans

un milieu contenant du tryptose ou un autre milieu, mis en incubation pendant quelques heures puis transféré sur un milieu gélosé puis de nouveau mis en incubation.

L'identification est basée en premier lieu sur les résultats des tests biochimiques. La fermentation des glucides est essentielle. Ces glucides qui sont fermentés sont : le glucose, le mannose, le galactose, le fructose, et le saccharose. Ceux qui ne fermentent pas sont le rhamnose, le cellobiose, le raffinose, l'inuline, l'érythritol, l'adonitol, le m-inositol, et la salicine. Le mannitol est habituellement fermenté. L'arabinose, le maltose, le lactose, et la dextrine ne fermentent pas habituellement. Des réactions variables sont observées avec le xylose, le tréhalose, le glycérol et le sorbitol. *Pasteurella multocida* ne produit pas d'hémolyse, n'est pas mobile et pousse rarement sur le milieu gélosé MacConkey. Elle est positive pour la catalase, l'oxydase, et l'ornithine-décarboxylase, mais ne produit pas d'uréase, de lysine-décarboxylase, de bêta-galactosidase, ou d'arginine-dihydrolase. La production de la phosphatase est variable. Le nitrate est réduit; l'indole et l'hydrogène sulfuré sont produits, et les tests au rouge de méthyl et Voges-Proskauer sont négatifs. La détection de la production d'hydrogène sulfuré peut nécessiter l'apport d'une bande de papier d'acétate chargé en plomb suspendu au dessus d'un milieu liquide contenant H₂S (8). Des kits pour les tests biochimiques sont commercialisés.

La différenciation de *P. multocida* des autres *Pasteurella* spp. aviaires et de *Riemerella (Pasteurella) anatipestifer* peut être obtenue habituellement en utilisant les tests et les résultats qui figurent dans le Tableau 1. L'expérience a montré que *P. multocida* est plus facilement identifiée par la morphologie de ses colonies et l'apparence après colorations de Gram. Les réactions positives avec l'indole et l'ornithine-décarboxylase apportent les indications biochimiques les plus utiles.

Tableau 1. Tests utilisés pour différencier *Pasteurella multocida* des autres espèces de *Pasteurella* aviaires et de *Riemerella anatipestifer*

Test*	<i>Pasteurella</i>		<i>Riemerella</i>
	<i>multocida</i>	<i>gallinarum</i>	<i>anatipestifer</i>
Hémolyse sur milieu gélosé au sang	-*	-	v
Culture sur milieu gélosé MacConkey	-	-	-
Production d'indole	+	-	-
Liquéfaction de la gélatine	-	-	+u
Production de catalase	+	+	+
Production d'uréase	-	-	v
Fermentation du glucose	+	+	-
Fermentation du lactose	-u	-	-
Fermentation du saccharose	+	+	-
Fermentation du maltose	-u	+	-
Ornithine-décarboxylase	+	-	-

* Résultats des tests : - = pas de réaction ; + = réaction; v = réactions variables ; -u = habituellement pas de réaction ; +u = habituellement une réaction.

La caractérisation antigénique de *P. multocida* est basée sur l'identification du sérotype capsulaire et du sérotype somatique. Les sérogroupes capsulaires sont identifiés par un test d'hémagglutination passive (1, 2). Les sérogroupes définis par hémagglutination passive sont A, B, D, E, et F. Tous les sérogroupes, excepté le E, ont été isolés à partir d'espèces aviaires. Un test non sérologique de diffusion sur disque, utilisant des mucopolysaccharidases spécifiques, a été développé et permet de différencier les sérogroupes A, D et F (6).

Les sérotypes somatiques sont habituellement identifiés par un test d'immunodiffusion en gélose (IDG) (4, 5). Les sérotypes 1 à 16 ont été reconnus. Ces 16 sérotypes ont été isolés à partir d'espèces aviaires (8). La caractérisation la plus efficace nécessite l'identification à la fois du sérotype et du sérotype. Ces identifications nécessitent le recours à un laboratoire spécialisé disposant des réactifs appropriés. Pour identifier le sérotype, le laboratoire doit en premier lieu préparer l'antigène pour IDG à partir cultures bactériennes inconnues puis le tester contre les 16 antisérums spécifiques pour le sérotypage. Les antigènes présents dans un seul isolat peuvent réagir avec plusieurs antisérums spécifiques d'un sérotype résultant en bi ou tri sérotypes, comme illustré avec les souches 3, 4 et 3, 4, 12 (8).

- **Protocole du typage somatique par le test d'immunodiffusion en gélose**

- i) Ensemencer une gélose amidon-dextrose (DSA pour *dextrose starch agar*) dans une boîte de 20 × 150 mm (contenant 70 ml de milieu) ou deux boîtes de 15 × 100 mm (contenant 20 ml de milieu par boîte), avec une culture fraîche de *Pasteurella multocida* à l'aide d'un écouvillon de coton stérile. Étaler sur toute la surface de (ou des) boîte(s) et incubé à 37 °C pendant 18 à 24 h. Ce protocole est utilisé pour produire l'antigène qui servira de témoin positif ou pour préparer l'antigène à partir des cultures ayant servi au diagnostic.
- ii) Récueillir les bactéries à partir des boîtes en les lavant avec 2,5 ml de sérum salé à 0,85 % contenant 0,6 % de formol et une anse stérile. Transférer la suspension de bactéries dans un tube avec une pipette stérile.
- iii) Autoclaver les bactéries à 100 °C pendant 1 h.
- iv) Centrifuger la suspension bactérienne à 13.300 *g* pendant 20 min.
- v) Éliminer le surnageant et transférer dans un tube stérile.
- vi) Préparer la gélose pour l'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) en mélangeant 17 g de NaCl, et 1,8 g d'agar noble dans 200 ml d'eau distillée dans un flacon de 500 ml. Passer le contenu du flacon au four à micro-ondes sans fermer le bouchon à fond pendant 2,5 min. Agiter le contenu par rotation et replacer au four à micro-ondes pour encore 2,5 min. Laisser la gélose refroidir doucement pendant 10 à 15 min. Ne pas préparer moins de 200 ml de gélose au four à micro-ondes. La déshydratation au cours du chauffage dans le four à micro-ondes risque d'augmenter la concentration de la gélose et avoir des conséquences négatives sur la diffusion voire l'inhiber.
- vii) Couler 5 ml de gélose fondue sur la surface d'une lame de microscope de 25 × 75 mm. Il est important que les lames soient bien horizontales avant de couler la gélose. Laisser la gélose refroidir complètement (environ 30 min).
- viii) Découper les puits dans la gélose : les puits ont un diamètre de 3 mm et sont distants de 3 mm de bord à bord. Une matrice d'Ouchterlony est souvent utilisée pour pratiquer 2 ou 3 séries de puits sur une même lame. Chaque série comprend un puits central entouré par 4 puits périphériques (angle de 90° entre chaque puits par rapport au centre).
- ix) L'antisérum de référence est toujours placé dans le puits central. L'antigène à tester pour confirmer le diagnostic ou l'antigène d'une culture de référence est placé dans un des puits périphériques. Chaque puits est rempli au maximum.
- x) Les lames sont incubées dans une chambre humide à 37 °C pendant 48 h. Les lignes de précipitation peuvent être mieux observées avec un éclairage tamisé par-dessous. Quand elles existent, les réactions positives apparaissent comme un arc de précipitation entre le puits central et un puits périphérique. Parfois, ces réactions sont proches des bords d'un puits. Les lames doivent donc être soigneusement observées. Les cultures pour le diagnostic peuvent réagir avec plus d'un antisérum somatique de référence.
- xi) Des témoins positifs doivent être incorporés. Dans chaque réaction, le sérum de référence doit être testé contre un antigène de référence.

L'empreinte de l'ADN de *P. multocida* par analyse de restriction de l'endonucléase s'est révélée efficace pour les études épidémiologiques du choléra aviaire dans les élevages de volailles. Les isolats de *P. multocida* ayant à la fois le même sérotype capsulaire et le même sérotype somatique peuvent être différenciés par cette technique. Les géloses colorées à l'éthidium-bromide sont analysées après électrophorèse de l'ADN digéré par l'endonucléase *HhaI* ou *HpaII* (10).

2. Épreuves sérologiques

Aucun test sérologique pour la recherche des anticorps spécifiques n'est utilisé pour le diagnostic du choléra aviaire. La facilité avec laquelle on obtient un diagnostic définitif avec l'isolement et l'identification de l'organisme exclut la nécessité d'un diagnostic sérologique. Les tests sérologiques, comme la séroagglutination, le test IDG et l'hémagglutination passive ont été utilisés expérimentalement pour démontrer la présence des anticorps dirigés contre *P. multocida* dans le sérum des espèces aviaires; toutefois aucun ne s'est révélé très sensible. La recherche des titres en anticorps utilisant la méthode immuno-enzymatique (ELISA) a été utilisée avec un succès variable dans le but de surveiller les séroconversions chez les volailles vaccinées mais non pour le diagnostic.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Le choléra aviaire peut être causé par l'un des 16 sérotypes d'Hedleston de *P. multocida*, bien que certains sérotypes apparaissent plus fréquemment associés à la maladie. Les vaccins contre *P. multocida* utilisent en général des bactéries inactivées dont le sérotype est sélectionné en fonction des données épidémiologiques, avec un adjuvant à l'hydroxyde d'aluminium ou huileux. Les bactéries des vaccins commerciaux correspondent habituellement aux sérotypes 1, 3, et 4. La vaccination joue un rôle significatif dans le contrôle de la maladie. Les vaccins à bactéries vivantes contenant *P. multocida* ne sont généralement pas utilisés excepté en Amérique du Nord.

Des lignes directrices pour la production des vaccins vétérinaires sont fournies dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices fournies ici et dans le Chapitre 1.1.8. se veulent générales et peuvent être complétées par des recommandations nationales ou régionales.

Les vaccins à bactéries tuées sont en général administrés par voie intramusculaire dans la cuisse ou les muscles du bréchet, ou en sous-cutané en arrière du cou. Classiquement, deux doses sont injectées entre 2 et 4 semaines d'intervalle. Comme c'est le cas pour la plupart des vaccins tués, l'immunité n'est complète lors d'une première vaccination qu'environ 2 semaines après la deuxième dose. Les vaccins à bactéries vivantes sont administrés dans l'eau de boisson. Il convient d'éviter de vacciner les oiseaux malades ou dans un mauvais état nutritionnel car une bonne réponse immunitaire pourrait ne pas être obtenue.

1. Méthode de fabrication

La méthode générale pour la production des bactéries inactivées de *P. multocida* est présentée ici. Les cultures pour la production de chaque isolat bactérien qui doit être compris dans le produit final sont préparées. Habituellement, ces cultures se font d'abord en petite quantité et des passages ultérieurs sur des volumes progressivement plus importants se font jusqu'à l'obtention du volume de production désiré. Chaque culture produite est inactivée par une solution de formol ou autres moyens équivalents. Les cultures et leurs constituants sont le plus souvent mélangés avec un adjuvant avant de remplir les récipients stériles finaux.

La section suivante est basée sur les recommandations de l'*United States Code of Federal Regulations* (Titre 9) consacrées aux bactéries inactivées de *P. multocida* et aux vaccins produits à partir de celles-ci. D'autres pays peuvent avoir des recommandations légèrement différentes.

2. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Toutes les souches de *P. multocida* devant être utilisées dans un vaccin doivent être bien caractérisées, de sérotype connu, pures, sans danger et immunogènes. La (ou les) culture(s), qui est évaluée et caractérisée, doit être désignée par un numéro de lot et dénommée comme étant le lot de semence primaire. Toutes les cultures utilisées dans la production de vaccins inactivés agréés doivent être obtenus à partir d'un (ou de) lot(s) de semence primaire agréée(s) et ceci après un nombre déterminé de passages à partir du lot de semence primaire.

b) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

i) Efficacité

Les produits préparés à partir des lots de semences primaires sélectionnés doivent montrer leur efficacité contre une infection expérimentale. Cette efficacité doit être démontrée pour chaque espèce animale (poulets, dindons, canards, psittacidés) et pour chaque voie d'administration pour lesquelles le produit est recommandé. La protection doit être démontrée par une épreuve pour chaque sérotype pour lequel une protection est affirmée. Le lot de produit utilisé pour le test d'efficacité doit correspondre au lot obtenu après le plus grand nombre de passages autorisés à partir du lot de semence primaire.

Pour les vaccins à *Pasteurella* aviaires vivantes, 20 oiseaux vaccinés et 10 témoins sont utilisés pour chaque essai d'efficacité. Les oiseaux ne sont pas éprouvés avant 14 jours suivant la vaccination et sont observés pendant les 10 jours suivant l'épreuve. Le test est satisfaisant si au moins 8 témoins meurent et si au moins 16 oiseaux vaccinés survivent.

La moyenne arithmétique du décompte des unités formant colonies dans le lot de produit employé pour démontrer l'efficacité est utilisée en tant que norme minimale (norme d'immunogénicité) pour tous les lots de production ultérieurs de vaccins.

L'efficacité des vaccins à bactéries inactivées doit être démontrée avant l'autorisation de mise sur le marché. Cependant aucune norme d'immunogénicité ne peut être déterminée à partir du lot testé initialement pour démontrer l'efficacité ; chaque lot produit doit donc être testé à l'aide d'une épreuve après vaccination avant la mise sur le marché et la distribution des vaccins qui en résultent.

ii) *Innocuité*

L'innocuité des lots de semence primaire utilisés dans la production des vaccins vivants doit être évaluée avant l'autorisation de mise sur le marché. L'innocuité doit être testée pour chaque espèce animale (poulets, dindons, canards, psittacidés) pour laquelle le produit est recommandé. Chaque oiseau d'un groupe de 10 sujets reçoit l'équivalent de 10 doses vaccinales et est observé pendant 10 jours. Au moins 8 oiseaux sur 10 ne doivent pas montrer de réaction défavorable pouvant être attribuée au lot de semence primaire. De plus, un test de réversion de la virulence et un test d'excrétion à partir de l'hôte et de transmission aux autres espèces cibles doivent être réalisés sur le lot de semence primaire.

La sécurité de chaque lot produit est testée selon les techniques décrites dans la Section C.4.c.

3. Contrôles en cours de fabrication

La pureté des cultures est vérifiée à chaque stade de production avant l'inactivation. Ceci peut être effectué par un examen microscopique (par ex. microscopie en contraste de phase, coloration de Gram) et/ou par culture. Les cultures de bactéries inactivées sont testées pour vérifier que l'inactivation est complète. Des tests analytiques sont effectués sur le produit final en vrac pour vérifier si les taux de formol ou d'autres agents inactivants restent dans les limites spécifiées. Pendant la production, les paramètres doivent être strictement contrôlés pour garantir que tous les lots sont produits de façon identique aux lots utilisés dans les études d'immunogénicité.

4. Contrôles des lots

a) *Stérilité*

Les tests de stérilité sont effectués sur le vaccin après mise en flacon. Chaque lot doit satisfaire aux recommandations pour la stérilité, comme, par exemple, ceux détaillés dans le 9 CFR Part 113.26 ou 113.27 (9). (Voir aussi le Chapitre 1.1.9)

b) *Innocuité*

Les tests d'innocuité sont effectués sur chaque lot en vrac et sur chaque lot de vaccin en flacons. Les vaccins à bactéries vivantes sont testés selon la méthode décrite dans C.1.c.ii, excepté qu'une seule espèce animale représentative est nécessaire. Les vaccins à bactéries tuées sont administrés selon les recommandations du fabricant et les oiseaux sont observés pendant 14 jours ; au moins dix-huit oiseaux sur vingt ne doivent pas présenter de réactions défavorables attribuables aux vaccins.

c) *Activité*

Le pouvoir immunogène de chaque lot de vaccin à bactéries tuées ou à bactéries vivantes doit être évalué grâce à un test conforme aux tests d'efficacité et considéré comme prédictif de cette efficacité. Les tests d'activité sont effectués sur le produit dans sa forme finale.

L'activité des vaccins à bactéries tuées est testée par un essai vaccination-épreuve. Deux groupes séparés d'oiseaux (vingt vaccinés, dix témoins) doivent être éprouvés avec chacun des sérotypes de *P. multocida* pour lesquels une protection est revendiquée. Les vaccins à bactéries tuées sont administrés selon la dose et la voie recommandées par le fabricant. Deux doses sont administrées à 3 semaines d'intervalle et tous les oiseaux sont éprouvés 2 semaines après la seconde dose. Les oiseaux sont observés pendant les 14 jours suivant l'épreuve. Le test est satisfaisant si au moins quatorze sur les vingt oiseaux vaccinés survivent et si au moins huit témoins sur dix meurent.

L'activité des vaccins à bactéries vivantes est déterminée par le décompte des bactéries pratiqué à partir du produit final lyophilisé reconstitué. Le nombre moyen de bactéries de chaque lot vaccinal venant juste d'être produit doit être suffisamment important pour garantir que, jusqu'à la date d'expiration du produit, ce nombre sera au moins deux fois celui de la norme d'immunogénicité (La Pharmacopée européenne exige un nombre au moins égal à celui de la norme d'immunogénicité).

d) Stabilité

L'acceptabilité de la durée de conservation du vaccin est confirmée en réalisant un test d'activité sur le produit lorsqu'il arrive à sa date de péremption préalablement approuvée. Au moins 3 lots de vaccins sont testés et doivent satisfaire aux critères établis pour l'activité. Les vaccins doivent être stockés entre 2 et 7 °C et protégés contre le gel. Les flacons partiellement utilisés au cours d'une journée doivent être quotidiennement jetés à la fin de l'opération.

e) Agents de conservation

Tous les agents de conservation doivent être ajoutés selon les limites spécifiées. Les agents de conservation sont habituellement ajoutés aux vaccins pour limiter la croissance de tout contaminant pouvant être introduit lorsque la capsule de caoutchouc du flacon est percée par une aiguille. L'idéal est d'utiliser du matériel pour une vaccination multidose qui permette de ne percer qu'une fois le flacon de vaccin avec une aiguille stérile.

f) Précautions d'emploi et mise en garde

Les vaccins préparés avec un adjuvant contenant de l'aluminium peuvent provoquer la formation de nodules temporaires au point d'injection. En cas d'auto-injection accidentelle du produit, il n'y a pas de problème immédiat, mais un avis médical doit être demandé en raison d'un risque d'infection par une aiguille contaminée.

Les vaccins préparés avec un adjuvant huileux peuvent provoquer de plus sévères réactions au point d'injection avec la formation de nodules importants. Des précautions doivent être prises pour une administration correcte de ces vaccins. En cas d'auto-injection accidentelle du produit, il faut exiger une assistance médicale immédiate, impliquant une incision rapide et une irrigation du site d'injection.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir Section C.4.b.

b) Activité

Voir Section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. CARTER G.R. (1955). Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.*, **16**, 481–484.
2. CARTER G.R. (1972). Improved hemagglutination test for identifying type A strains of *Pasteurella multocida*. *Appl. Microbiol.*, **24**, 162–163.
3. DERIEUX W.T. (1978). Response of young chickens and turkeys to virulent and avirulent *Pasteurella multocida* administered by various routes. *Avian Dis.*, **22**, 131–39.
4. HEDDLESTON K.L. (1962). Studies on pasteurellosis. V. Two immunogenic types of *Pasteurella multocida* associated with fowl cholera. *Avian Dis.*, **6**, 315–321.
5. HEDDLESTON K.L., GALLAGHER J.E. & REBERS P.A. (1972). Fowl cholera: Gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.*, **16**, 925–936.
6. RIMLER R.B. (1994). Presumptive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D, and F by capsule depolymerisation with mucopolysaccharidases. *Vet. Rec.*, **134**, 191–192.
7. RIMLER R.B. & GLISSON J.R. (1997). Fowl cholera. In: Diseases of Poultry, Tenth Edition, Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R. & Saif Y.M., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 143–159.
8. RIMLER R.B., SANDHU T.S. & GLISSON J.R. (1998). Pasteurellosis, Infectious Serositis, and Pseudotuberculosis. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fourth

Edition, Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E. & Reed W.M., eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania, USA, 17–28.

9. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2001). Code of Federal Regulations, Title 9, Animals and Animal Products. Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration. US Government Printing Office, Washington D.C., USA.
10. WILSON M.A., RIMLER R.B. & HOFFMAN L.J. (1992). Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroups B and E *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1518–1524.

*
* *

VARIOLE AVIAIRE

RÉSUMÉ

La variole aviaire est une maladie affectant les poulets et les dindes qui est due à un virus appartenant au genre Avipoxvirus de la famille des Poxviridae. Elle est présente dans le monde entier, faiblement contagieuse et se caractérise par la présence de lésions cutanées prolifératives et de croûtes sur la peau ainsi que de lésions diphtériques sur les muqueuses digestives et respiratoires supérieures. La forme cutanée est moins grave que la forme diphtérique avec notamment un taux de mortalité moindre. Dans la forme diphtérique, les lésions varioliques situées sur le tractus respiratoire (narines, larynx, trachée) peuvent entraîner une dyspnée et la mort par asphyxie.

La variole est à l'origine d'une chute de ponte et affecte les performances de croissance des oiseaux.

Identification de l'agent pathogène : *la variole aviaire doit être suspectée en présence de lésions cutanées éruptives. L'examen histologique des lésions cutanées ou muqueuses met en évidence une hyperplasie de l'épithélium et la présence d'inclusions intracytoplasmiques dans les cellules infectées. Des corps élémentaires peuvent être visualisés sur des calques de lésions colorés avec la méthode de Gimenez. L'observation des lésions en microscopie électronique par coloration négative ou sur coupes ultrafines révèle la présence de particules virales dont la morphologie est caractéristique de celle des poxvirus.*

La forme diphtérique affectant la trachée doit être différenciée de la laryngotrachéite infectieuse, due à un herpesvirus et caractérisée par des corps d'inclusion intranucléaires.

L'isolement du virus peut être réalisé en inoculant des œufs embryonnés de poulet âgés de 9 à 12 jours sur la membrane chorio-allantoïdienne.

Épreuves sérologiques : *la réponse immunitaire contre le virus de la variole peut être mise en évidence par séroneutralisation, immunodiffusion en gélose (IDG), immunofluorescence, hémagglutination passive, méthode immuno-enzymatique (ELISA) ou immuno-empreinte (immunoblotting).*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *des vaccins vivants atténués contre la variole aviaire ou la variole du pigeon sont disponibles. La vaccination est indiquée dans les zones d'enzootie ou en début d'infection après un diagnostic.*

A. INTRODUCTION

La morphologie du virus de la variole aviaire est semblable à celle de tous les autres virus de la famille des *Poxviridae*. Le virus mature (corps élémentaires) a une forme de brique dont les dimensions sont environ de 330 × 280 × 200 nm. La membrane extérieure est composée de tubules de surface disposés de manière aléatoire. Le virion est constitué d'un core (ou nucléoïde) biconcave situé en région central et dense aux électrons avec deux corps latéraux situés dans les parties concaves et entourés par une enveloppe. Le génome du virus de la variole aviaire comprend 288 kpb et code plus de 250 gènes.

La variole aviaire est une maladie présente dans le monde entier et due à un virus à ADN appartenant au genre *Avipoxvirus* de la famille des *Poxviridae* (17, 21). Selon les zones géographiques, son importance est variable en fonction des conditions climatiques, des méthodes d'élevage, des pratiques d'hygiène ainsi que des pratiques vaccinales. Elle est à l'origine de chutes de ponte ou de retards de croissance chez les oiseaux.

La variole est une maladie faiblement contagieuse affectant les poulets et les dindes. La forme cutanée (variole sèche) est caractérisée par des lésions prolifératives qui vont de nodules de petite taille à des verrues situées sur la peau de la crête, des barbillons ainsi que des autres zones non emplumées. Dans la forme diphtérique (variole humide), des nodules blancs opaques légèrement proéminents se développent sur les muqueuses. Leur taille augmente rapidement jusqu'à confluer en une membrane diphtérique jaunâtre. Les lésions siègent sur les muqueuses de la cavité buccale, de l'œsophage, du larynx et de la trachée. Le taux de mortalité est plus élevé dans le cas de la forme diphtérique que dans la forme cutanée, approchant dans certains cas 50 %, en particulier chez les jeunes animaux. L'intégration du génome du virus de la réticulo-endothéliose (REV pour *Reticuloendotheliosis Virus*) a été mise en évidence dans le génome du virus de la variole (11, 13). Il est intéressant de noter que cet événement a eu lieu il y a 50 ans (7). Alors que la plupart des souches virales sauvages contiennent le provirus REV, les souches vaccinales n'en possèdent que des vestiges sous la forme des séquences terminales répétées (LTR pour *Long Terminal Repeats*) (13). La présence du provirus REV est associée à une virulence plus importante des souches sauvages concernées. Le génome d'une souche de type vaccinal du virus de la variole aviaire a été séquencé en totalité (1). Les fonctions de la plupart des gènes sont encore inconnues. Il est cependant intéressant de constater que le virus peut persister très longtemps dans l'environnement des poulailers alors que d'autres virus ne peuvent survivre. La présence dans le génome viral d'un gène de la photolyase et du gène des corps d'inclusion de type A semble protéger le virus des attaques du milieu extérieur (15, 16). Au plan antigénique, des réactions croisées sont observées entre les poxvirus aviaires et il semble que de nombreux gènes soient conservés. Il existe quelques études comparatives limitées sur les propriétés antigéniques, génétiques et biologiques entre le virus de la variole aviaire et les autres poxvirus aviaires notamment ceux qui affectent les oiseaux sauvages. Récemment, la séquence complète du génome du canarypox a été publiée.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

La réplication du virus de la variole dans le cytoplasme des cellules épithéliales s'accompagne de la formation de corps d'inclusion intracytoplasmiques de grande taille (corps de Bollinger) dans lesquels se trouvent des particules élémentaires de plus petite taille (corps de Borrel). Les inclusions peuvent être mises en évidence dans des coupes de lésions cutanées ou diphtériques après coloration à l'hématoxyline-éosine, l'acridine orange ou le colorant de Giemsa (19). Les corps élémentaires peuvent être visualisés dans des calques de lésions, par exemple par la méthode de Gimenez (18), décrite ci-après. La microscopie électronique permet de visualiser les particules virales typiques des poxvirus après coloration négative ou réalisation de coupes ultrafines de tissu infecté (3).

a) Technique de frottis pour la mise en évidence de poxvirus

- i) Placer une goutte d'eau distillée et la lésion (cutanée ou diphtérique) sur une lame propre. Préparer un frottis fin en effectuant une pression à l'aide d'une deuxième lame propre et en effectuant plusieurs rotations de la lame supérieure ;
- ii) Laisser sécher à l'air puis fixer doucement au dessus d'une flamme ;
- iii) Colorer le frottis pendant 5 à 10 min à l'aide d'une solution préparée extemporanément de colorant primaire (10 ml d'une solution stock¹ de fuchsine diluée dans 10 ml de tampon phosphate², pH 7,5 ; et filtrée à l'aide de papier filtre Whatman No. 1) ;
- iv) Laver abondamment à l'eau courante ;
- v) Contrecolorer avec du vert de malachite (à 0,8 % en eau distillée) pendant 30 à 60 s ;
- vi) Laver à l'eau courante et sécher ;
- vii) Examiner le frottis avec un microscope à immersion. Les corps élémentaires sont rouges et leur taille est d'environ 0,2 à 0,3 µm.

b) Isolement viral

Le virus de la variole peut être isolé par inoculation de matériel potentiellement infecté à des œufs embryonnés de poulet. Environ 0,1 ml de suspension tissulaire (lésions cutanées ou diphtériques) additionnée d'antibiotiques en concentration adéquate est inoculé sur la membrane chorio-allantoïdienne

1 Solution stock : Une solution de fuchsine basique (5 g) dans de l'éthanol 95 % (100 ml) est mélangée lentement à une deuxième solution de phénol cristallin (10 g dans 900 ml d'eau distillée). Cette solution stock est conservée dans une bouteille en verre à bouchon à vis serré, incubée 48 h à 37 °C, puis stockée à température ambiante.
 2 Tampon phosphate pH 7,5 : NaH₂PO₄H₂O (2,47 g), Na₂HPO₄ (11,65 g) dans 1 000 ml d'eau distillée et stockage à 4 °C.

d'embryons de poulets âgés de 9 à 12 jours. Après 5 à 7 jours d'incubation à 37 °C, la membrane chorio-allantoïdienne présente soit des pustules, soit un épaississement généralisé. L'examen histologique des lésions permet de visualiser la présence de corps d'inclusion éosinophiles intra-cytoplasmiques après coloration à l'hématoxyline-éosine (19, 22).

Le virus de la variole peut également être cultivé sur des cultures de cellules de première explantation de fibroblastes, de cellules rénales ou de cellules dermiques d'embryon de poulet ou encore sur la lignée de cellules de caille QT-35 (6, 10). Une adaptation des souches virales aux systèmes cellulaires peut être nécessaire pour la formation de plages de lyse.

c) Méthodes moléculaires

L'analyse du polymorphisme des fragments du génome viral après digestion par des enzymes de restriction (RFLP pour *Restriction fragment length polymorphism*) est utilisée pour la comparaison de souches sauvages et de souches vaccinales (6, 10). Cette technique n'est cependant pas employée en routine.

Des fragments de génome clonés peuvent être utilisés comme sondes nucléiques pour le diagnostic. L'ADN viral isolé de lésions peut être mis en évidence après hybridation à l'aide de sondes marquées (radioactives ou non). Cette méthode permet en particulier de différencier le virus de la variole du virus de la laryngotrachéite infectieuse dans des lésions trachéales (5).

Des fragments d'ADN génomique de différentes tailles peuvent être amplifiés par une amplification en chaîne par polymérase (PCR) à l'aide d'amorces spécifiques (4, 8). Une PCR nichée a ainsi été récemment décrite pour la détection du virus de la variole (4). Cette méthode est intéressante lorsque la quantité d'ADN viral dans l'échantillon est faible.

2. Épreuves sérologiques

Bien qu'à la fois l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité humorale soient impliquées dans les infections à poxvirus, l'immunité cellulaire n'est pas explorée en routine. Ainsi les épreuves sérologiques telles que la séroneutralisation virale, l'immunodiffusion en gélose (IDG), l'hémagglutination passive, l'immunofluorescence ainsi que des techniques immuno-enzymatiques (ELISA) sont utilisées pour quantifier l'immunité humorale spécifique. Le contrôle d'une immunisation effective après vaccination par voie transcutanée peut être réalisé 7 à 10 jours après vaccination. La présence d'une inflammation ou de lésions varioliques au site de vaccination indique une bonne prise vaccinale.

a) Séroneutralisation virale

Après mise en contact du virus avec le sérum à tester, une activité virale résiduelle est testée sur œufs embryonnés de poulet ou sur culture cellulaire (9). Cette méthode complexe au point de vue technique ne convient pas pour un diagnostic de routine. Toutes les souches virales n'ont pas la propriété de provoquer la formation de plages de lyse sur cellules embryonnaires de poulet. Les anticorps neutralisants apparaissent 1 à 2 semaines après infection.

b) Immunodiffusion en gélose

Les anticorps précipitants peuvent être mis en évidence en faisant réagir le sérum à tester avec des antigènes viraux. Les antigènes viraux peuvent être obtenus par sonication ou homogénéisation de lésions varioliques cutanées ou de lésions de membrane chorio-allantoïdienne ou par traitement des cellules en culture infectées par la méthode décrite ci-après (Chapitre B.2.f). La suspension lysée est centrifugée et le surnageant est utilisé comme antigène. Le milieu de diffusion en gélose est préparé avec 1 % d'agarose, 8 % de chlorure de sodium et 0,01 % de thiomersol. L'antigène viral est placé dans le puits central et les sérums à tester dans les puits périphériques. Il est important d'inclure un sérum témoin positif et négatif. Les plaques sont incubées à température ambiante. Les arcs de précipitation apparaissent après 24 à 48 h d'incubation entre un sérum et un anticorps dirigé contre la souche virale de l'épreuve ou contre une souche proche. Cette épreuve est moins sensible que l'ELISA (2) ou que l'épreuve d'hémagglutination passive (23).

c) Hémagglutination passive

Des hématies de mouton ou de cheval fixées (tannées) sont sensibilisées avec de l'antigène viral de la variole partiellement purifié (20). L'antigène est préparé à partir de membrane chorio-allantoïdienne ou de cellules infectées comme décrit dans le Chapitre B.2.f ci-après. L'hémagglutination passive est plus sensible que l'immunodiffusion en gélose. Des réactions croisées entre différents poxvirus des oiseaux sont possibles.

d) Immunofluorescence

Les épreuves d'immunofluorescence directe ou indirecte mettent en évidence la fluorescence spécifique dans le cytoplasme de cellules infectées. L'épreuve d'immunofluorescence indirecte est utilisée en routine et se déroule en deux étapes : l'anticorps dirigé contre le virus de la variole est mis au contact de l'antigène viral présent dans les cellules infectées, puis un anticorps secondaire marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine dirigé contre les immunoglobulines de poulet (chèvre anti-poulet) est ajouté. De tels anticorps marqués sont disponibles dans le commerce. Pour cette épreuve, des coupes de tissu fixé au formol peuvent être utilisées.

e) Immunoperoxydase

Le marquage d'inclusions cytoplasmiques est possible avec des anticorps spécifiques du virus de la variole aviaire marqués à la peroxydase sur des coupes de tissus fixés (membrane chorio-allantoïdienne ou peau) réhydratées ou sur cellules en culture. Des résultats similaires sont obtenus avec des anticorps monoclonaux ou polyclonaux utilisés dans une épreuve indirecte. Un avantage de la technique est que les coupes peuvent être examinées en microscopie optique et peuvent être stockées pendant une longue période sans perte de couleur (19).

f) Épreuve immuno-enzymatique (ELISA)

Des tests ELISA ont été mis au point pour détecter l'immunité humorale contre le virus de la variole. Ils permettent la mise en évidence des anticorps 7 à 10 jours après infection (2), mais des kits de diagnostic commercialisés ne sont pas encore disponibles.

Les antigènes de virus de la variole sont préparés soit à partir de cultures de cellules QT-35 ou de lésions de membrane chorio-allantoïdienne. Les cellules QT infectées sont décollées et centrifugées (700 *g* pendant 10 min à 4 °C), lavées en tampon isotonique (10 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM d'acide éthylène diamine tétra-acétique [EDTA]) puis lysées en tampon hypotonique (10 mM Tris, pH 8,0, 10 mM KCl, 5 mM EDTA) contenant 0,1 % de Triton X-100 et 0,025 % de β-mercaptoéthanol. Les noyaux et débris cellulaires sont éliminés par centrifugation lente (500 *g* pendant 5 min à 4 °C) et le surnageant est utilisé comme source d'antigène pour les ELISA et l'immuno-empreinte. Afin d'isoler l'antigène viral à partir de lésions de membrane chorio-allantoïdienne, un broyage initial des lésions puis un traitement avec un détergent comme décrit précédemment peut être nécessaire. Des fibroblastes ou des cellules dermiques embryonnaires de poulets infectés ont également été utilisés comme sources d'antigènes. La méthode de préparation de l'antigène est alors identique à celle décrite pour les cellules QT.

Des puits de plaque de microtitrage sont incubées avec 1 µg d'antigène soluble dans 100 µl de tampon d'incubation (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6) et incubés une nuit à 4 °C (2, 19). Les puits sont rincés une fois avec une solution de lavage (0,29 M Na Cl, 0,05 % Tween 20) et saturés avec du tampon PBS pH 7,4 contenant 3 % albumine sérique bovine (BSA) pendant 1 h à 37 °C. Après un lavage, des dilutions sériées des sérums à tester sont réalisées dans du PBS contenant 1 % de BSA puis déposées dans les puits. Après 2 h d'incubation à 37 °C sous agitation, les puits sont lavés 3 fois avant d'ajouter 100 µl par puits d'une solution d'anticorps anti-IgG (H+L) de poulet³ conjugué à la peroxydase à la dilution recommandée en PBS. Après 2 h d'incubation à 37 °C et 3 lavages, 100 µl de substrat de la peroxydase (TMB³) sont ajoutés dans chaque puits. Les réactions sont arrêtées avec de l'acide phosphorique à 1 M puis l'absorbance à 450 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur ELISA⁴.

g) Immuno-empreinte (Immunoblotting)

Les différences antigéniques entre souches de virus peuvent être mises en évidence par immuno-empreinte ou Western blot. Dans cette méthode, les antigènes séparés par électrophorèse (SDS-PAGE pour *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) réagissent avec des anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre le virus de la variole (6, 12, 14). Cette méthode ne convient pas pour les diagnostics de routine

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il est possible de protéger les poulets contre la variole en utilisant du virus de la variole du pigeon ou de la variole du poulet (21, 23). La vaccination est indiquée dans les zones d'enzootie ou en début d'infection lorsque la variole a précédemment été diagnostiquée. Des virus vivants de la variole du poulet ou du pigeon, ainsi que des

3 Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland, États-Unis d'Amérique.

4 Dynatech, Chantilly, Virginia, États-Unis d'Amérique.

vaccins dans lesquels le virus de la variole est utilisé comme vecteur et qui protègent contre la variole sont disponibles. Ces vaccins sont préparés à partir d'embryons de poulets ou de cultures de cellules d'oiseaux.

Les lignes directrices pour la production des vaccins vétérinaires sont décrites dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices énoncées ci-après ainsi que dans le Chapitre 1.1.8. se veulent générales et peuvent être complétées par des recommandations nationales ou régionales.

L'immunité passive doit être prise en compte pour la vaccination de la descendance de troupeaux qui ont connu un épisode récent d'infection ou qui ont été récemment vaccinés. Etant donné que l'immunité passive est susceptible d'interférer pendant 2 à 3 semaines avec la multiplication du virus vaccinal, ces oiseaux doivent être vaccinés après disparition des anticorps maternels. Le vaccin contre la variole est administré par transfixion de la membrane alaire.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Un lot de semence primaire du virus doit être constitué et utilisé selon un système de lot de semence. Une trace de son origine doit être gardée, ainsi qu'un historique des passages et leurs caractéristiques. Les virus utilisés sont soit le virus de la variole du poulet, soit celui de la variole du pigeon. Le lot de semence primaire doit être cultivé dans des conditions correctes avec du matériel qui est en accord avec les normes. L'absence de contamination, mais également la pureté et l'identité du lot de semence primaire doivent être vérifiées.

b) Méthode de culture

Le lot de semence primaire doit être cultivé sur des embryons de poulets exempts d'organisme pathogène spécifique (EOPS), par inoculation sur la membrane chorio-allantoïdienne ou sur des cultures cellulaires d'oiseaux telles que des cultures de cellules embryonnaires de poulet de première explantation : fibroblastes, cellules rénales ou cellules dermiques.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

i) Pureté

Le lot de semence primaire doit être neutralisé avec un sérum spécifique avant d'être testé pour sa pureté. En raison de la difficulté à neutraliser les virus de la variole des oiseaux, il est possible de centrifuger le lot de semence primaire à 1 000 *g* pendant 20 min, puis de le filtrer au travers d'un filtre à 0,2 µm de porosité. Le lot de semence primaire filtré ou neutralisé doit ensuite être testé pour vérifier l'absence de contaminants. Ces tests sont réalisés sur œufs embryonnés ou cultures cellulaires, afin de démontrer l'absence de virus répliquatif exogène, ainsi que sur des poulets EOPS afin de vérifier l'absence d'apparition d'anticorps dirigés contre des agents exogènes.

ii) Innocuité

Seules les souches virales atténuées de façon stable ou les isolats sauvages faiblement virulents peuvent être utilisés pour la fabrication de vaccins.

L'innocuité du vaccin doit être démontrée en utilisant la voie d'administration recommandée, à savoir la transfixion de la membrane alaire, sur des animaux sensibles de tous âges. Un test permettant l'évaluation de l'innocuité consiste en l'administration du vaccin à des poussins EOPS par transfixion de la membrane alaire à l'aide d'une aiguille trempée dans le vaccin. Les oiseaux sont ensuite observés pendant 7 à 10 jours afin de vérifier la prise vaccinale et l'absence d'effets secondaires attribuables au vaccin. La prise vaccinale consiste en une réaction inflammatoire ou une lésion variolique au site d'application du vaccin et constitue un témoin de la prise vaccinale. Le test d'innocuité doit être renouvelé après au minimum 6 passages du virus sur des poulets EOPS afin de vérifier l'absence de réversion de la virulence.

iii) Efficacité

Des tests doivent être réalisés en utilisant le passage le plus élevé (5^e passage à partir du lot de semence primaire) et le plus faible titre de virus envisageables pour le produit final : 20 poulets EOPS âgés de l'âge minimal auquel la vaccination est indiquée reçoivent une dose de vaccin par la méthode recommandée. 3 semaines après cette vaccination, infecter à l'aide d'une souche virulente par scarification les animaux vaccinés ainsi que 20 autres poulets du même âge et de la même origine mais non vaccinés. Les oiseaux sont observés 3 semaines plus tard. Des lésions dues au virus sauvage doivent être observables sur 90 % des oiseaux témoins alors que 90 % des poulets vaccinés ne doivent pas présenter de lésions.

2. Méthode de fabrication

Le vaccin est fabriqué en utilisant un système de lot de semence à partir du lot de semence primaire. Ceci doit être réalisé de façon à éviter toute contamination. Tous les milieux et cellules utilisés pour la culture doivent être exempts de contamination.

3. Contrôles en cours de fabrication

Au cours du processus de validation du vaccin, les données d'efficacité doivent être mises en relation avec le titre viral du vaccin, afin de documenter l'efficacité de façon correcte. Le vaccin doit être conditionné en unités contenant une concentration virale suffisante pour assurer l'activité prévue.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et d'absence de contamination des réactifs biologiques sont décrits dans le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Le test d'innocuité dans le Chapitre C.1.c.ii ci-dessus, à l'exception des six passages sur poulets EOPS, doit être mis en œuvre sur chaque lot de vaccin.

c) Activité

Des tests vérifiant les titres viraux doivent être mis en œuvre sur au moins trois conditionnements. Les dilutions doivent couvrir l'étendue de l'infectiosité possible de 0 à 100 %, être de raison 5 et être au minimum au nombre de 7 par série. Les tests doivent être réalisés en parallèle sur un vaccin de référence, s'il en existe. Chaque lot de vaccin doit être titré dans le diluant adéquat. Le titre viral ne doit pas être supérieur à 1/10 de la dose à laquelle le vaccin a montré son innocuité et ne doit pas être inférieur au titre « release » déterminé lors du test d'efficacité. Un titre correct pour un vaccin variole atténué se situe aux alentours de 10^5 DIE₅₀ (dose de virus infectant 50 % des embryons) par ml.

d) Durée de l'immunité

Le test d'efficacité décrit dans le Chapitre C.1.c.iii peut être utilisé pour déterminer la durée de l'immunité (environ 6 à 12 mois) en procédant à des tests à différents temps après la vaccination, et en utilisant des groupes d'animaux différents pour chacun des tests.

e) Stabilité

La preuve de la stabilité doit être apportée pour justifier la date de péremption. Des titrages réguliers du virus vaccinal doivent être réalisés jusqu'à 3 mois après la date de péremption sur au moins 6 lots de vaccin stockés selon les recommandations du fabricant.

f) Agents de conservation

Les agents de conservation ne sont pas présents dans les vaccins vivants.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Il est déconseillé de vacciner des volailles en cours de ponte. Éviter le contact des humains avec le vaccin vivant. Les vaccins de la variole du poulet classiques ne doivent pas être utilisés chez le pigeon, chez lesquels il convient d'utiliser le vaccin dédié à l'espèce. Dans de nombreux pays le vaccin destiné aux pigeons dérive du vaccin destiné aux poussins de 1 jour. Ces vaccins peuvent être utilisés sans danger chez le pigeon en l'absence de vaccin spécifique.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Le test d'innocuité décrit dans le Chapitre C.1.c.ii ci-dessus est utilisé sur chaque lot.

b) Activité

Le test d'activité décrit dans le Chapitre C.4.c ci-dessus est utilisé sur chaque lot.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé grâce à une subvention de l'Illinois Agricultural Experiment Station Regional Project.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AFONSO C.L., TULMAN E.R., LU Z., ZSAK L., KUTISH G.F. & ROCK D.L. (2000). The genome of fowlpox virus. *J. Virol.*, **74**, 3815–3831.
2. BUSCAGLIA C., BANKOWSKI R.A. & MIERS L. (1985). Cell-culture virus neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of immunity in chickens against fowlpox. *Avian Dis.*, **29**, 672–680.
3. DOANE F.W. & ANDERSON N. (1987). *Electron Microscopy in Diagnostic Virology: A Practical Guide and Atlas*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
4. FALLAVENA L.C., CANAL C.W., SALLE C.T., MORAES H.L., ROCHA S.L. & PEREIRA DA SILVA A.B. (2002). Presence of avipoxvirus DNA in avian dermal squamous cell carcinoma. *Avian Pathol.*, **31**, 241–246.
5. FATUNMBI O.O., REED W.M., SCHWARTZ D.I. & TRIPATHY D.N. (1995). Dual infection of chickens with pox and infectious laryngotracheitis (ILT) confirmed with specific pox and ILT DNA dot-blot hybridization assays. *Avian Dis.*, **39**, 925–930.
6. GHILDYAL N., SCHNITZLEIN W.M. & TRIPATHY D.N. (1989). Genetic and antigenic differences between fowlpox and quailpox viruses. *Arch. Virol.*, **106**, 85–92.
7. KIM T.J. & TRIPATHY D.N. (2001). Reticuloendotheliosis virus integration in the fowlpoxvirus genome: not a recent event. *Avian Dis.*, **45**, 663–669.
8. LEE L.H. & LEE K.H. (1997). Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowlpoxvirus infection. *J. Virol. Methods*, **63**, 113–119.
9. MORITA C. (1973). Studies on fowlpox viruses. II. Plaque neutralization test. *Avian Dis.*, **17**, 93–98.
10. SCHNITZLEIN W.M., GHILDYAL N. & TRIPATHY D.N. (1988). Genomic and antigenic characterisation of avipoxviruses. *Virus Res.*, **10**, 65–76.
11. SINGH P., KIM T.-J. & TRIPATHY D.N. (2000). Re-emerging fowlpox: evaluation of isolates from vaccinated flocks. *Avian Pathol.*, **29**, 449–455.
12. SINGH P., KIM T.-J. & TRIPATHY D.N. (2003). Identification and characterisation of fowlpox virus strains using monoclonal antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 50–54.
- 16.13 SINGH P., SCHNITZLEIN W.M. & TRIPATHY D.N. (2003). Reticuloendotheliosis virus sequences within the genomes of field strains of fowlpox virus display variability. *J. Virol.*, **77**, 5855–5862.
14. SINGH P. & TRIPATHY D.N. (2000). Characterization of monoclonal antibodies against fowlpoxvirus. *Avian Dis.*, **44**, 365–371.
15. SRINIVASAN V., SCHNITZLEIN W.M. & TRIPATHY D.N. (2001). Fowlpox virus encodes a novel DNA repair enzyme, CPD-photolyase, that restores infectivity of UV light-damaged virus. *J. Virol.*, **75**, 1681–1688.
16. SRINIVASAN V. & TRIPATHY D.N. (2005). The DNA repair enzyme, CPD-photolyase restores the infectivity of UV-damaged fowlpox virus isolated from infected scabs of chickens. *Vet. Microbiol.*, **108**, 215–223.
17. TRIPATHY D.N. (1993). Avipoxviruses. In: *Virus Infections of Vertebrates – Virus Infections of Birds*, Vol. 4, McFerran J.B. & McNulty M.S., eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands, 5–15.

- 18 TRIPATHY D.N. & HANSON, L.E. (1976). A smear technique for staining elementary bodies of fowlpox. *Avian Dis.*, **20**, 609–610
- 19 TRIPATHY D.N., HANSON L.E. & KILLINGER A.H. (1973). Immunoperoxidase technique for detection of fowlpox antigen. *Avian Dis.*, **17**, 274–278.
- 20 TRIPATHY D.N., HANSON L.E. & MYERS W.L. (1970). Passive hemagglutination test with fowlpox virus. *Avian Dis.*, **14**, 29–38.
- 21 TRIPATHY D.N. & REED W.M. (2003) Pox. *In: Diseases of Poultry*, 11th Edition, Saif, Y.M., Barnes, H.J. Glisson, J.R. Fadly, A.M., McDougald L.R. & Swayne, D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 253-269.
22. TRIPATHY D.N. & REED W.M. (1998). Pox. *In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, Fourth Edition, Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M W., Pearson J.E., & Reed W.M., eds. American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, New Bolton Center, Kennett Square, PA 19348-1692, USA, 137–140.
23. WINTERFIELD R.W. & HITCHNER S.B. (1965). The response of chickens to vaccination with different concentrations of pigeon pox and fowlpox viruses. *Avian Dis.*, **9**, 237–241.

*
* *

TYPHOSE ET PULLOROSE

RÉSUMÉ

Définition de la maladie : la pullorose du poulet est due à *Salmonella enterica subspecies enterica serovar Gallinarum biovar Pullorum* (*Salmonella Pullorum*)¹. À l'heure actuelle, dans certains pays, *Gallinarum* est considéré comme le sérovar, mais dans d'autres il s'agit de *Pullorum* ; dans le chapitre suivant, le sérovar sera appelé *Gallinarum* ou *Pullorum* selon le biovar dont il s'agit. La forme aiguë de cette maladie est spécifiquement une affection septicémique chez les poussins. Cependant, l'agent responsable peut être aussi associé à une maladie des dindonneaux inapparente ou entraînant une baisse de ponte et d'éclosion, ainsi qu'un certain nombre de symptômes atypiques chez les oiseaux âgés. La transmission ovarienne est le principal mode de contamination de la maladie. Le gibier à plumes et les volailles de basse-cour sont les principaux réservoirs de l'infection et les oiseaux sauvages peuvent être vecteurs de l'agent infectieux, jouant ainsi un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie.

La typhose des poulets et des dindons est due à *S. Gallinarum biovar Gallinarum*. Elle est plus souvent observée chez des oiseaux plus âgés ou adultes. Elle est souvent caractérisée par une extension rapide avec une très forte morbidité et une mortalité élevée ou modérée. Les poux rouges pourraient être impliqués dans la transmission de la maladie et sa persistance dans les poulaillers.

La salmonellose due à *Salmonella bongori* ou d'autres sous-espèces de *Salmonella enterica* est décrite dans le chapitre 2.9.9., « *Salmonelloses* » de ce Manuel terrestre.

Description de la maladie : les symptômes chez les poussins et les dindonneaux sont une anorexie, une diarrhée, une déshydratation, de l'apathie et la mort. Chez les oiseaux adultes, la pullorose est moins sévère et l'on peut observer une diminution du taux de ponte, un faible taux d'éclosion et une augmentation du taux de mortalité. La typhose apparaît sous forme septicémique aiguë qui touche surtout les oiseaux adultes et peut se révéler particulièrement grave dans les élevages industriels de poules pondeuses.

Identification de l'agent pathogène : il ne faut pas effectuer de prélèvements sur les oiseaux ou les œufs ayant reçu un traitement antimicrobien. Sont utilisés pour le diagnostic, des écouvillons ou des prélèvements effectués de manière aseptique sur des organes infectés, ou du contenu intestinal ou cloacal. Les autres prélèvements possibles sont les œufs, les embryons, les fientes et les débris de l'éclosion, en particulier le duvet, la poussière et les restes de coquilles cassées ainsi que les boîtes de transport des poussins. Les prélèvements de choix sont les amygdales caecales et la rate des oiseaux infectés de préférence aux échantillons fécaux ou environnementaux. Le plus rapidement possible après leur prélèvement, les tissus doivent être mis en culture sur des milieux enrichis sélectifs et non sélectifs et sur milieu gélosé sélectif comme la gélose vert brillant. Sinon, ils doivent être conservés à 4 °C. Les colonies bactériennes peuvent être identifiées à l'aide de tests sérologiques et biochimiques.

Épreuves sérologiques : ces épreuves permettent de confirmer la présence de l'infection et d'en estimer la prévalence au sein du troupeau. Le test utilisé sur le terrain est celui de l'hémo-agglutination rapide sur lame. Ce test est peu fiable chez le dindon et le canard car de nombreux oiseaux non infectés peuvent donner des réactions faussement positives. Au laboratoire,

1 Voir la note dans le Chapitre 2.9.9. « *Salmonelloses* », pour les données de base concernant la nomenclature de *Salmonella*.

on emploie le test de séro-agglutination soit sur lame soit en tube. Les méthodes utilisées peuvent être une macro ou une micro-agglutination, mais cette dernière peut donner plus facilement des réactions faussement positives avec les sérums de dindons. Il faut confirmer par un examen bactériologique post-mortem que les animaux infectés sont positifs. L'utilisation de la méthode immuno-enzymatique (ELISA) a été rapportée mais il n'y a pas de test commercialisé.

L'utilisation de vaccins pour la lutte contre les infections dues à *S. Enteritidis* chez le poulet peut présenter des problèmes dans l'interprétation des résultats sérologiques.

Vaccins et produits biologiques destinés au diagnostic : des vaccins vivants et inactivés contre la typhose aviaire sont disponibles dans certains pays. Le vaccin le plus employé est un vaccin vivant préparé à partir d'une souche stable rugueuse de *S. Gallinarum* dénommée '9R'.

A. INTRODUCTION

La typhose et la pullorose, dues à *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovars *Gallinarum* biovars *Gallinarum* et *Pullorum*, respectivement, sont des affections rencontrées dans le monde entier mais qui ont été éradiquées des élevages intensifs dans plusieurs pays développés de l'Europe de l'Ouest, aux États-Unis d'Amérique (USA), au Canada, en Australie et au Japon. Aux États-Unis et au Royaume-Uni, le sérovar est dénommé *Pullorum* (8) ; dans ce chapitre, on utilisera les termes sérovars *Gallinarum* ou *Pullorum*. Cependant, *S. Gallinarum* a réapparu récemment dans certains pays européens (18). *Salmonella Pullorum* persiste chez les oiseaux sauvages et les oiseaux de compagnie. *Salmonella Gallinarum* et *S. Pullorum* sont des germes adaptés aux espèces aviaires et le risque zoonotique lié à ces germes est considéré comme minimal (19), bien que le génome soit en évolution constante, ce qui pourrait théoriquement élargir le spectre d'hôtes à l'avenir (12).

La salmonellose due à *Salmonella bongori* ou d'autres sous-espèces de *Salmonella enterica* est décrite dans le chapitre 2.9.9., « Salmonelloses » de ce *Manuel terrestre*.

Les symptômes sont caractéristiques d'une atteinte septicémique chez les volailles et l'on observe une augmentation de la mortalité et une mauvaise qualité des poussins provenant des œufs infectés. Les oiseaux plus âgés présentent une anémie, une apathie, une respiration laborieuse et de la diarrhée qui colle à l'orifice cloacal. Le taux de mortalité le plus important est observé chez les oiseaux âgés de 2 à 3 semaines. Chez les animaux plus âgés la maladie peut être bénigne ou inapparente. Dans les élevages de reproducteurs les seuls symptômes peuvent être une diminution des taux de ponte et d'éclosabilité. La transmission verticale de la maladie provoquant une infection de l'œuf et des oiseaux à l'éclosion représente la voie la plus importante de contamination de la maladie.

Les lésions de la pullorose observées chez poussins âgés de quelques jours sont une péritonite associée à une congestion de tous les tissus, et une rétention d'un sac vitellin enflammé. Une infection de plus longue durée se traduit par une typhlite avec dépôt de foyers nécrotiques et des foyers de nécrose punctiformes dans le foie, les poumons et d'autres viscères. De petites lésions sur le foie et la rate des oiseaux infectés par *S. Pullorum* ont une apparence de « petits points blancs » qui ne sont pas observées avec *S. Gallinarum* ; cependant ces lésions ne sont pas pathognomoniques. La capacité de colonisation de ces *Salmonella* n'est pas élevée et leur survie dans le tractus digestif est un indicateur des phases terminales de la maladie clinique. Les oiseaux adultes présentent des ovaires déformés ou rabougris, avec les follicules fixés par des pédoncules fibreux. Les souches variantes de *S. Pullorum* ne provoquent pas, en général, de maladie clinique ou peuvent entraîner des signes bénins non-spécifiques, tout en entraînant une séroconversion.

Lors de typhose, du fait d'une septicémie généralisée, le foie est généralement hypertrophié, sombre et friable avec une couleur vert-bronze caractéristique qui peut n'apparaître qu'après exposition à l'air. La moelle osseuse est aussi souvent brunâtre. Bien que les aspects cliniques et lésionnels de la pullorose et de la typhose soient très évocateurs dans ces conditions, ils ne sont pas suffisamment pathognomoniques pour les différencier des autres causes de septicémies. C'est pourquoi il est nécessaire de confirmer la maladie par la mise en évidence des agents pathogènes. Des épreuves sérologiques permettent de confirmer la présence de la maladie dans le troupeau.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Dans sa forme aiguë, la pullorose est une maladie presque toujours rencontrée chez les jeunes poussins et l'agent peut être isolé dans de nombreux organes, tissus et fèces. Chez les oiseaux plus âgés qui peuvent être porteurs, *S. Pullorum* est le plus souvent isolé des ovaires et des oviductes ; elle n'est retrouvée qu'exceptionnellement dans d'autres organes et tissus, y compris le tractus digestif. Dans la forme aiguë de la

typhose la salmonelle est retrouvée dans de nombreux tissus, mais chez les oiseaux porteurs elle est surtout présente dans le foie, dans la rate, dans l'appareil reproducteur et parfois dans les caecaux.

- **Culture**

Salmonella Pullorum et *S. Gallinarum* appartiennent au séro groupe D du schéma de Kauffmann-White, au même titre que *S. Enteritidis*, qui lui est très proche. Ces bactéries sont des bâtonnets non sporulés, Gram négatives, de 1,0 à 2,5 µm de longueur et 0,3 à 1,5 µm de largeur. Elles sont considérées comme non mobiles dans des conditions normales, mais parfois on a pu observer l'apparition de protéines flagellaires et une certaine mobilité quand *S. Pullorum* est cultivée dans certains milieux spéciaux (9).

Pour un isolement optimal des bactéries, les oiseaux ne doivent pas avoir été traités préalablement par des agents antimicrobiens pendant au moins 2 à 3 semaines.

Les prélèvements doivent être effectués sur des oiseaux vivants, de préférence après avoir identifié les oiseaux fortement séropositifs. Il est aussi possible de récupérer des carcasses fraîches ou conservées sous froid, des œufs, des fèces ou du matériel du bâtiment, des incubateurs ou des boîtes de transport. Les écouvillons cloacaux doivent être effectués sur des oiseaux vivants. Il vaut mieux prélever sur des organes présentant des lésions macroscopiques et non les fèces ou dans l'environnement. Des prélèvements aseptiques peuvent être effectués sur la rate, le foie, la vésicule biliaire, les reins, les poumons, le cœur, l'ovaire, les testicules, le tractus digestif ou les lésions articulaires. La surface est cautérisée avec une spatule chauffée et le prélèvement est pratiqué en insérant un écouvillon de coton stérile ou une anse stérile à travers la surface stérilisée par chauffage. La confirmation de l'infection chez les animaux séropositifs apparemment sains nécessite parfois la mise en culture d'un volume important de tissus homogénéisés et des prélèvements directs par écouvillonnages. Les homogénats tissulaires peuvent provenir de plusieurs oiseaux.

Lors des prélèvements de litière et de fèces, il faut se rappeler que *S. Pullorum* et *S. Gallinarum* sont plus difficiles à isoler que les autres salmonelles dans ce type de prélèvement, et il est préférable de mettre en culture des prélèvements récoltés sur des animaux malades ou morts depuis peu. Les prélèvements sur le milieu extérieur peuvent provenir des bottes, des fientes sur le sol, des litières sèches et humides et des écouvillons prélevés au niveau des abreuvoirs de plein air. Les poux rouges associés aux volailles peuvent être infectés par *S. Gallinarum* le plus souvent à la suite de leur repas sur l'hôte et peuvent être cultivés. Ils doivent être mis en culture par inoculation directe d'un milieu enrichi sélectif comme le sélénite de cystéine, puis par ensemencement sur milieu sélectif comme le milieu gélosé au vert brillant (17).

S. Pullorum et *S. Gallinarum* se cultivent bien sur des milieux non sélectifs, mais les milieux sélectifs et enrichis contiennent des substances qui inhibent la croissance d'autres organismes exogènes. *Salmonella* Pullorum a une croissance lente et ne produit que de très petites colonies sur milieux sélectifs ; il est donc recommandé d'incuber les boîtes pendant 48 h. L'efficacité de la mise en évidence de *Salmonella* varie selon les circonstances et l'expérience dans l'emploi des milieux de cultures est un facteur important mais difficile à quantifier. Quelques milieux complexes ont un effet inhibiteur sur ces organismes. C'est pourquoi il paraît avisé d'utiliser à la fois des milieux sélectifs et non sélectifs pour l'isolement à partir des tissus. Les milieux liquides et solides peuvent être employés. Comme les propriétés toxiques des milieux sélectifs peuvent varier, il est préférable de les contrôler en comparant les croissances de cultures témoins sur les deux types de milieux. Le milieu sélectif inhibiteur doit permettre la culture d'au moins 75 % des colonies par comparaison avec le milieu correspondant sans inhibiteur (3, 4, 7, 13).

Les exemples des milieux mentionnés ci-dessous sont tous couramment utilisés mais d'autres donnent également satisfaction.

Les milieux non-inhibiteurs comprennent de la gélose nutritive et de la gélose au sang sur lesquelles les colonies observées sont lisses, translucides, légèrement surélevées et d'un diamètre de 2 mm environ. *Salmonella* Gallinarum a une croissance plus rapide que *S. Pullorum* et donne naissance à des colonies plus grandes ayant, sur la plupart des milieux, une odeur caractéristique semblable à celle du liquide séminal. Les milieux comprennent de l'eau peptonée tamponnée et un apport nutritif comme les bouillons de viande ou des bouillons universels enrichis.

- **Les milieux sélectifs comprennent :**

Gélose MacConkey : la gélose est inhibitrice pour les organismes non entériques, elle permet de différencier les bactéries fermentant le lactose (colonies roses) de celles ne le fermentant pas (colonies non colorées). Il n'y a pas de NaCl pour limiter la multiplication des colonies de *Proteus*. Les colonies de *Salmonella* sont lisses et incolores. *Salmonella* Pullorum produit des colonies plus petites que les autres salmonelles. MacConkey est la gélose de choix pour la mise en culture directe des prélèvements tissulaires.

Gélose « xylose lysine deoxycholate » : la gélose est inhibitrice pour les organismes non entériques. *Salmonella Pullorum* se multiplie de façon parsemée en formant des petites colonies translucides de couleurs légèrement rouge. Les colonies de *S. Gallinarum* sont petites, formant un dôme pointu et peuvent présenter un point central noir dû à une production d'H₂S, mais cette réaction peut être retardée ou variable.

Gélose au vert brillant (GVB) : la gélose est inhibitrice pour les coliformes et la plupart des souches de *Proteus* ; elle est utile pour distinguer les colonies de bactéries entériques. Les salmonelles forment des colonies en dépression, convexes, rouge pâle, translucides, d'un diamètre de 1 à 3 mm similaires aux colonies de *Citrobacter*. Les colonies de *Proteus* sont punctiformes (en tête d'épingle), celles de *Pseudomonas aeruginosa* sont petites et rouges alors que les bactéries fermentant le lactose apparaissent vertes. *Salmonella Pullorum* produit des colonies pâles plus petites que les autres salmonelles. GVB est la gélose de choix après un enrichissement.

Gélose au vert brillant à la sulphapyridine : la gélose est inhibitrice pour les coliformes et les souches de *Proteus*. La sulphapyridine est ajoutée pour stabiliser la sélection en présence des œufs. *Salmonella Pullorum* produit de petites colonies.

Salmonella Pullorum et *Gallinarum* poussent difficilement et ne produisent pas des colonies typiques sur les nouvelles géloses chromogènes comme la gélose Rambach.

- **Liquide d'enrichissement et milieux sélectifs**

Bouillon au sélénite F : inhibiteur pour les coliformes mais non pour *Proteus*, amélioré par l'ajout de vert brillant. Perte de l'activité après 24 h. La cystéine-sélénite est plus stable. Bien que les milieux au sélénite soit préférés pour l'isolement de *S. Pullorum* et de *S. Gallinarum* à partir des fientes, les bouillons mentionnés ci-dessous peuvent être utilisés en cas de difficultés pour des questions de toxicité ou de durée de conservation dans certains laboratoires. La plupart des autres bouillons sont prévus pour être utilisés après une phase d'enrichissement non sélectif et *S. Gallinarum* et *S. Pullorum* sont facilement supplantés par des micro-organismes contaminants lors de cultures fécales en milieu non-sélectifs, ce qui peut donner des résultats faussement négatifs. Il est donc recommandé de traiter les échantillons de fèces, de contenu intestinal ou de l'environnement en milieux sélectif pour enrichissement. Des milieux d'enrichissement non-sélectifs peuvent donner de meilleurs résultats pour les tissus lors d'autopsie prélevés de manière aseptique en l'absence de micro-organismes contaminants (16).

Bouillon au vert brillant/tetrathionate : inhibiteur des coliformes et de *Proteus*, mais peut aussi inhiber certaines souches de *S. Pullorum/Gallinarum*.

Bouillon peptoné de Rappaport-Vassiliadis au soja (RVS) : pour enrichissement sélectif après un pré-enrichissement, à utiliser avec une partie d'inoculum pour 100 parties de milieu. *Salmonella Pullorum* et *Gallinarum* ont plus de risques d'être supplantées par d'autres organismes pendant le pré-enrichissement des fientes ou du contenu intestinal que les salmonelles qui ne sont pas adaptées à l'hôte ; il est possible de tenter un enrichissement direct avec le bouillon RVS.

- **Isolement des salmonelles**

Les méthodes permettant d'isoler *S. Pullorum* et *S. Gallinarum* varient selon l'origine des prélèvements. Alors que l'isolement à partir des écouvillons cloacaux et des fientes peut être mal récompensé, généralement l'examen des prélèvements tissulaires lors de l'autopsie rencontre plus de succès. Les méthodes sont les suivantes :

Écouvillons cloacaux et fientes fraîches provenant d'oiseaux vivants : les prélèvements placés dans un milieu nutritif sont adéquats, les prélèvements étant petits pour les jeunes poussins. Les prélèvements sont mis en culture sur des milieux sélectifs et placés dans un bouillon d'enrichissement. Les plaques et les milieux sont incubés à 37 °C. À cette température quelques organismes comme les *Proteus* et les *Pseudomonas* ont tendance à être inhibés comparés à *Salmonella*. Des températures supérieures peuvent être utilisées avec certains milieux comme par exemple 41,5 °C avec le milieu Rappaport-Vassiliadis (RVS), mais avec précaution car certains milieux d'enrichissement peuvent se révéler trop inhibiteurs à de fortes températures et le milieu RVS est plus inhibiteur que le milieu au sélénite de cystéine pour les cultures de *S. Pullorum* and *S. Gallinarum*. Des repiquages sont réalisés sur milieu sélectif après 24 et 48 h.

Bile : des écouvillons du contenu de la vésicule biliaire sont ensemencés sur des milieux gélosés sélectifs et non sélectifs et placés dans des milieux inhibiteurs et non inhibiteurs, puis incubés à 37 °C avec des subcultures sur milieu sélectif après 24 à 48 h.

Organes et tissus : des écouvillons ou des échantillons tissulaires sont prélevés de façon aseptique à partir de tissus et de lésions et mis en culture sur des milieux sélectifs et non sélectifs ainsi que dans des bouillons similaires. Ils sont mis en incubation à 37 °C et remis en culture sur milieu gélosé sélectif après 24 et 48 h. Les

prélèvements intestinaux sur bouillons sélectifs peuvent aussi être incubés à 40 °C ; *S. Gallinarum* pousse bien mais il peut y avoir une inhibition de *S. Pullorum* à cette température.

Oiseaux porteurs asymptomatiques : de fortes quantités de matériel peuvent être nécessaires pour identifier les oiseaux porteurs asymptomatiques. L'ovaire et l'oviducte sont les tissus de choix pour *S. Pullorum*, alors que l'on recherche *S. Gallinarum* dans le foie et la vésicule biliaire, mais aussi dans l'ovaire ou l'oviducte. En pratique, il est généralement recommandé d'inoculer un mélange des divers échantillons incluant la rate. Les tissus sont homogénéisés dans un petit volume de bouillon et directement ensemencés. Approximativement 10 ml du mélange est aussi ajouté à 100 ml d'un bouillon d'enrichissement non sélectif (par ex. de l'eau peptonée tamponnée) et un bouillon sélectif d'enrichissement (par ex. un bouillon au sélénite de cystéine ou vert brillant), et mis en incubation à 37 °C. Ces bouillons sont ensuite remis en culture sur des géloses sélectives et non sélectives après 24 h.

Tube digestif dont les amygdales caecales et le contenu intestinal : après broyage ou homogénéisation dans un petit volume de bouillon, 10 ml de ce mélange est placé en incubation dans 100 ml d'un bouillon d'enrichissement à 37 °C. En général, le bouillon au sélénite de cystéine est meilleur pour les isollements.

Coquilles d'œufs : les coquilles d'œufs cassées sont mélangées à 10 fois leur volume à un milieu d'enrichissement (par ex. un bouillon au sélénite de cystéine). Le bouillon est mis en incubation à 37 °C puis remis en culture sur milieu gélosé sélectif après 24 et 48 h.

Contenu de l'œuf : le contenu d'œufs frais est prélevé de façon aseptique, homogénéisé et mélangé à 200 ml d'eau peptonée tamponnée ou de milieu nutritif, mis en incubation à 37 °C, puis remis en culture sur des géloses sélectives et non sélectives après 24 h et 48 h. Les œufs en incubation, infertiles ou contenant un embryon de petite taille, sont traités de façon similaire.

Embryons : les viscères homogénéisées et les écouvillons du vitellus des embryons bien développés peuvent être ensemencés sur des milieux gélosés non sélectif et sélectif d'enrichissement, un écouvillon étant placé dans 10 ml d'un bouillon d'enrichissement non sélectif et d'un milieu sélectif d'enrichissement (par ex. un bouillon au sélénite de cystéine ou au vert brillant). Le bouillon est mis en incubation à 37 °C puis remis en culture sur des milieux gélosés non sélectif et sélectif après 24 et 48 h.

Échantillons de l'environnement : il s'agit des duvets de couvoir, des débris d'œufs ou d'œufs macérés/des échantillons de déchets de poussins et des échantillons de fientes de poussins sur les boîtes de transport ou des prélèvements de litière ou de fientes sur le sol ; 25 g de ces échantillons sont mélangés avec 225 ml de bouillon d'enrichissement (par ex. un bouillon au sélénite de cystéine ou au vert brillant), mis en incubation à 37 °C, puis remis en culture sur un milieu gélosé sélectif après 24 et 48 h.

Des épreuves basées sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) peuvent aussi être utilisées mais elles n'ont pas été complètement validées au niveau international (15).

1. Identification de l'agent pathogène

Les colonies caractérisant *S. Gallinarum* sur un milieu sélectif sont rondes, translucides, luisantes, bombées, lisses, d'un diamètre de 1 à 2 mm après 24 à 48 h d'incubation. Les colonies de *Salmonella Pullorum* sont légèrement plus petites et translucides. Sur un milieu sélectif l'aspect des colonies varie avec le milieu, mais les colonies suspectes peuvent être identifiées par une épreuve sérologique avec les antigènes somatiques O₉, des tests biochimiques et l'observation de la mobilité.

Après une incubation pendant 20 à 24 h, les boîtes de gélose doivent être examinées soigneusement pour déceler la présence de colonies caractéristiques de *S. Pullorum* et *S. Gallinarum*. Si la croissance est faible après 24 h d'incubation, les boîtes de gélose doivent être remises en incubation pendant 24 h supplémentaires et réexaminées. Pour l'examen en vue d'une confirmation biochimique et sérologique de chaque boîte de gélose, 5 colonies caractéristiques ou suspectes doivent être choisies. S'il y a moins de 5 colonies typiques ou suspectes, toutes doivent être récoltées pour un examen ultérieur. Les colonies sélectionnées doivent être ensemencées à la surface d'un milieu gélosé nutritif permettant la croissance de colonies séparées. Seules les cultures pures obtenues sur un milieu non sélectif seront utilisées pour l'identification biochimique. Les milieux inoculés avec une anse d'ensemencement comprennent les ingrédients suivants : gélose « triple sugar iron » (TSI) ; gélose « lysine iron » (ou milieu « l-lysine decarboxylation ») ; gélose à l'urée selon Christensen ; milieu tryptone/tryptophane pour la réaction à l'indole ; glucose et tube courbé de Durham pour la production d'acide et de gaz ; dulcitol, maltose, milieu d'ornithine decarboxylation et gélose semi-solide, pour la mobilité. Les réactions produites sont montrées dans le tableau 1.

Il existe des kits d'identification dans le commerce, comme le système API (*Analytical Profile Index*) pour les Enterobacteriaceae. Cependant, il faut être prudent lors de l'utilisation du système API car *S. Pullorum* ne peut

pas être différenciée de *Hafnia* spp. Des tests moléculaires utilisant les techniques de ribotyping et de PCR ont été développées dans des laboratoires de recherche (10), mais elles ne sont pas disponibles généralement pour identifier *S. Gallinarum* et *S. Pullorum*.

Pour identifier le sérotype par examen sérologique, on utilise des colonies obtenues sur milieu non sélectif (gélose nutritive ou au sang). Le premier stade est l'élimination des souches auto-agglutinables. Pour cela il faut prélever une colonie isolée d'une culture pure et la placer sur une lame de verre et la mélanger avec une goutte de sérum physiologique stérile. La lame subit un léger mouvement de balancement ou la goutte est mélangée avec une anse pendant 30 à 60 s et l'on vérifie sur fond noir la présence ou non d'une agglutination, de préférence à l'aide d'une loupe ou d'une loupe binoculaire. Si la bactérie s'est massivement agglutinée en unités plus ou moins distinctes, la souche est considérée auto-agglutinable et ne doit pas être utilisée pour les tests suivants. Si l'échantillon bactérien est reconnu non auto-agglutinable, il est testé avec un anti-sérum polyvalent 'O' (A–G). Pour cela le prélèvement d'une colonie isolée est mélangé à une goutte de l'anti-sérum polyvalent 'O' (A–G) sur une lame en vue d'obtenir une suspension homogène et trouble. Après avoir balancé la lame pendant 30 à 60 s, on recherche la présence d'une agglutination sur un fond noir. Alternativement le test d'agglutination sur lame peut être réalisé avec de plus petits volumes de suspension en employant une loupe binoculaire. Dans ce cas, la partie de la colonie à examiner doit être mélangée avec une anse pleine de sérum physiologique sur la lame du microscope pour obtenir une légère suspension en vue d'observer l'auto-agglutination (souches rugueuses). Si l'on n'observe pas d'agglutination, on ajoute une ou deux gouttes d'antisérum, la goutte est remuée avec une anse et l'on recherche l'agglutination. *Salmonella Pullorum* et *S. Gallinarum* doivent agglutiner avec l'anti-sérum polyvalent 'O' mais non avec l'antisérum polyvalent flagellaire (poly 'H' phase 1 et phase 2). Si la réaction est positive, la colonie isolée est ensuite testée de la même manière avec l'antisérum de groupe spécifique (antisérum 'O'9) des sérotypes de *S. Pullorum* et de *S. Gallinarum*. Après le typage du groupe sérologique les isolats peuvent être adressés à un laboratoire pour identifier le sérotype.

Tableau 1. Étude biochimique de *Salmonella Pullorum* et de *S. Gallinarum*

	<i>Salmonella Pullorum</i>	<i>Salmonella Gallinarum</i>
TSI glucose (Formation d'acide)	+	+
TSI glucose (Formation de gaz)	v	-
TSI lactose	-	-
TSI saccharose	-	-
TSI sulphide d'hydrogène	v	v
Gaz avec du glucose (milieu avec le tube de Durham)	+	-
Hydrolyse de l'urée	-	-
Décarboxylation de la lysine	+	+
Décarboxylation de l'ornithine	+	-
Fermentation du maltose	- ou + tardif	+
Dulcitol	-	+
Mobilité	-	-

+ = réaction positive à 90 % ou plus en 1 à 2 jours ; - = Pas de réaction (à 90 % ou plus); v = Réactions variables.

Il est aussi possible de confirmer et de différencier *S. Gallinarum* grâce à une épreuve PCR spécifique (18).

- **Protocole pour la culture d'échantillons viscéraux, fécaux, intestinaux et environnementaux pour *S. Pullorum* et *S. Gallinarum***
 - i) Quand cela est possible les tests doivent être commencés le jour même de la collecte des échantillons ;
 - ii) Le matériel doit être homogénéisé autant que possible par un mélange manuel, après macération ou digestion douce dans un petit volume de sérum physiologique stérile si le matériel est sec ;
 - iii) Remuer ce mélange à l'aide d'un écouvillon rectal ou d'une anse et déposer une couche épaisse en stries sur le quart d'une boîte de milieu gélosé au vert brillant (les écouvillons provenant de tissus non contaminés récoltés de façon aseptique peuvent être aussi mis en culture sur une gélose au sang) ;
 - iv) À partir de ce matériel déposé sur la boîte, ensemercer le reste de la boîte en striant pour obtenir des colonies isolées ;

- v) Ajouter 5 à 25 g de l'échantillon homogénéisé à un bouillon au sélénite de cystéine fraîchement préparé (cf note ci-dessus sur les milieux d'enrichissement sélectifs et liquides) pour obtenir un ratio 1:10 pour l'échantillon et le bouillon. Remuer ou agiter pour disperser l'échantillon dans le bouillon ;
- vi) Incuber les boîtes de gélose au vert brillant et les milieux au sélénite de cystéine à 37 °C pendant 24 h ;
- vii) Examiner les boîtes après 24 h de culture. Prélever à partir d'au moins 5 colonies suspectes pour effectuer les tests d'agglutination avec de l'anti-sérum polyvalent 'O' (A–G) et de l'antisérum polyvalent flagellaire (poly 'H' phase 1 et phase 2). Si les tests d'agglutination sont difficiles à lire pour les colonies suspectes repiquées sur gélose nutritive ou gélose au sang, il faut répéter les tests après 24 h d'incubation supplémentaires pour ces milieux ;
- viii) Si le test avec l'antisérum polyvalent 'O' est positif, il faut ensuite tester avec l'antisérum 'O'9. Si le test avec 'O'9 est positif et le test avec l'antisérum polyvalent 'H' négatif, ceci indique la présence possible de *S. Pullorum* ou de *S. Gallinarum* ;
- ix) S'il n'y a pas de colonies positives sur le milieu gélosé au vert brillant, reprendre avec une anse 10 µl de bouillon au sélénite de cystéine pour ensemercer une gélose au vert brillant comme au stade iv ci-dessus ;
- x) Incuber les boîtes de gélose au vert brillant à 37 °C pendant 24 h et remettre à incuber les boîtes de gélose précédentes (négatives) au vert brillant ainsi que les bouillons au sélénite de cystéine pendant 24 h supplémentaires ;
- xi) Répéter les examens des boîtes comme au stade vii ci-dessus ;
- xii) Si les boîtes sont toujours négatives, repiquer du bouillon au sélénite de cystéine et mettre en incubation une boîte de gélose au vert brillant ensemencée à l'étape ix, pendant de nouveau 24 h et examiner comme au stade vii ci-dessus ;
- xiii) Confirmer par l'emploi des tests biochimiques selon le tableau 1 la présence de *S. Pullorum* ou de *S. Gallinarum*. Les isolats peuvent être envoyés au Laboratoire de référence des *Salmonella* en vue d'une confirmation du sérotype et du typage phagique de *S. Pullorum*.

• Épidémiologie moléculaire

Les techniques moléculaires « d'empreinte génétique » de référence mises au point pour la recherche des *Salmonella*, comme l'analyse du profil plasmidique, l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) ou le typage ribosomique peuvent être utilisées pour rechercher les foyers de *S. Pullorum* ou de *S. Gallinarum*. Une association de ces méthodes est souvent nécessaire pour obtenir une meilleure discrimination.

2. Épreuves sérologiques

Les épreuves sérologiques seront meilleures si elles sont utilisées en tant que diagnostic d'élevage car si elles sont effectuées sur des individus, elles pourront varier selon le stade de l'infection. Il est cependant nécessaire de collecter suffisamment d'échantillons individuels si l'on veut diagnostiquer une infection au sein de l'élevage. Le nombre d'échantillons dépendra de la prévalence estimée et du niveau de confiance désiré (voir Chapitre 1.1.1., « Prélèvement et expédition des échantillons pour le diagnostic »). Si l'épreuve est pratiquée en vue d'une éradication des oiseaux infectés, elle doit être répétée au moins 2 fois et de préférence jusqu'à l'obtention de deux tests négatifs pour tous les individus de l'élevage.

Les épreuves les plus faciles à réaliser sont l'hémo-agglutination rapide sur lame, la séro-agglutination rapide sur lame (SARL), l'agglutination en tube et la micro-agglutination (21). D'autres *Salmonella* invasives telles que *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* peuvent donner des résultats faussement positifs lors d'épreuves sérologiques pour *S. Pullorum*.

S. Pullorum et *S. Gallinarum* possèdent toutes deux les antigènes 'O' 9 et 12 et peuvent aussi posséder l'antigène O 1. Cependant, dans le cas de *S. Pullorum*, il y a une variation dans le ratio de 12₁, 12₂ et 12₃ ; la souche de référence contient plus de 12₃ que de 12₂, alors que l'inverse est vrai pour la forme variante. Des formes intermédiaires existent aussi (On n'observe pas de telles variations dans le cas de *S. Gallinarum*). Quand cette variation survient, il est nécessaire d'utiliser un antigène polyvalent pour les tests de diagnostic immunologique. Le même antigène est employé pour la détection de *S. Pullorum* et de *S. Gallinarum*, mais la détection de cette dernière peut être relativement faible (17).

a) Test d'hémo-agglutination rapide sur lame

Le test d'hémo-agglutination peut être utilisé dans les conditions du terrain pour détecter à la fois *S. Pullorum* et *S. Gallinarum*, et les réactions peuvent être observées immédiatement. Cependant ce test n'est pas fiable chez les dindons en raison de trop nombreux résultats faussement positifs. Les poulets peuvent être testés à tout âge bien que certaines recommandations officielles spécifient un âge minimum de 4 mois (21, 22) et que les résultats positifs chez les poussins âgés de moins de 4 semaines puissent être dus aux anticorps vitellins.

- **Préparation de l'antigène coloré pour le test d'agglutination rapide sur sang total ou sur sérum**

Incuber une souche de la forme de référence de *S. Pullorum* (de structure antigénique 9, 12₁, 12₃) et une de la forme variante (de structure antigénique 9, 12₁, 12₂) à 37 °C et récolter séparément jusqu'au mélange final de l'antigène complet.

Ensemencer les souches sur des milieux gélosés inclinés séparés, mettre en incubation à 37 °C pendant 24 h, puis émulsifier les colonies avec du sérum physiologique stérile et étaler l'inoculum dans une boîte de gélose pour produire et sélectionner facilement des colonies séparées. Pour cela les boîtes doivent être mises en incubation pendant 48 h, un nombre de colonies sont repérées et chacune subit le test d'agglutination sur lame avec de l'acriavine diluée au 1/500 dans du sérum physiologique. Les colonies en phase lisse ne s'agglutinent pas. Prélever des colonies typiques qui ne produisent pas d'agglutination, les ensemencer sur les milieux gélosés inclinés, et mettre en incubation pendant 24 h. Émulsifier la production obtenue dans du sérum physiologique et distribuer uniformément 2 ml sur la surface du milieu (200 ml) dans un flacon de Roux ou un flacon similaire. Incuber les flacons pendant 60 h.

Pour la récolte de la production bactérienne, noyer la surface de chaque flacon avec suffisamment de solution physiologique stérile et tamponnée de pH 6,5 (8,5 g/litre de chlorure de sodium, 10 ml/litre solution de formol, 4 ml/litre 0,5 M phosphate de sodium : compléter jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée, ajuster le pH à 6,5 en utilisant de l'acide orthophosphorique 1 M ou de l'hydroxyde de sodium 1 M), pour obtenir une suspension dense de cellules (environ 10 ml par flacon). Ajouter 12 à 15 billes de verre stériles de 3 à 5 mm de diamètre et secouer les flacons jusqu'à la mise en suspension de toute la production ; maintenir en position verticale pendant au moins 15 min. Vérifier la morphologie et la pureté des suspensions par la préparation de frottis et leur examen après coloration de Gram. Récolter en vrac la suspension de chaque flacon contenant les mêmes souches. Ajouter 200 ml d'alcool absolu à chaque 100 ml de suspension. Agiter le mélange et laisser reposer 36 h ou jusqu'à précipitation complète. Vérifier l'agglutinabilité du précipité des formes de référence et variante par une première centrifugation d'un échantillon pour séparer l'alcool qui est retiré puis on dilue avec du sérum physiologique et l'on teste avec des sérums témoins positifs et négatifs. Si le résultat est satisfaisant, éliminer le surnageant alcoolique (une centrifugation à 2 000 g pendant 10 min peut aider à la sédimentation), et ajouter une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) contenant 10 % (v/v) de glycérol pour normaliser la densité à 75 × No. 1 « Wellcome opacity tube » (ou 50 × tube No. 1,0 sur l'échelle de McFarland). Ajouter des volumes équivalents de souches de référence et variante puis ajouter 1 % (v/v) d'une solution alcoolique de cristal violet 3 % (w/v) au mélange final et laisser reposer pendant 48 h à la température du laboratoire. Entreposer dans un récipient fermé hermétiquement à 0-4 °C jusqu'à 6 mois. Pour vérifier la sécurité, prélever un échantillon pour un test de culture sur gélose au sang démontrant la non viabilité de l'antigène non lavé avant la normalisation. Chaque flacon d'antigène doit être testé après la précipitation alcoolique et avant la normalisation avec des antisérums de référence pour *S. Pullorum* et *S. Gallinarum* et avec un sérum négatif. Si possible, tester aussi des sérums et des sangs provenant de poussins reconnus positifs et négatifs.

Les antigènes colorés pour le test d'agglutination sur lame pour le sang total sont disponibles dans le commerce, et bien qu'il y ait quelques légères différences dans leur sensibilité (5), il est peu probable que des troupeaux de volailles infectées avec les différents variants de *S. Pullorum*, échappent au test.

- **Protocole**

- i) Utiliser un carreau blanc désinfecté et divisé en carrés de 3 cm de côté. Si 3 × 4 carrés sont utilisés on peut tester jusqu'à 12 prélèvements sanguins en même temps ;
- ii) Déposer une goutte (environ 0,02 ml) d'antigène coloré au cristal violet dans le centre de chaque carré ;
- iii) Prélever du sang total frais. En pratique ceci est réalisé par une scarification de la veine alaire à l'aide d'une pointe triangulaire ;
- iv) Placer une goutte de sang total d'un volume similaire près d'une goutte d'antigène ;
- v) Mélanger les deux gouttes d'antigène et de sang avec une fine tige de verre qui sera nettoyée après chaque prélèvement ;

- vi) Balancer doucement le carreau pour agiter les gouttes pendant au moins 2 min. Plusieurs tests peuvent être réalisés simultanément sur le même carreau, mais les gouttes ne doivent pas sécher pendant ce temps. Lorsqu'il fait très chaud, des gouttes plus importantes peuvent être nécessaires pour éviter un séchage ;
- vii) Une réaction positive est observée par la présence d'agglutinats en amas bien visibles dans les 2 min ;
- viii) L'absence de ces amas d'antigène au bout de 2 min correspond à une réaction négative ;
- ix) Lors de chaque test, il est nécessaire de vérifier comme avec le sang les sérums témoins négatif et positif ;
- x) À l'achèvement de la série de tests, le carreau est lavé et séché, prêt à une autre utilisation.

En l'absence de réactions positives, toute réaction douteuse doit être seulement interprétée à la lumière de l'anamnèse d'élevage et vis-à-vis des tests antérieurs pour *Salmonella*. Quand il y a des réactions positives, chaque réaction douteuse doit être considérée comme positive. De plus, des oiseaux infectés récents peuvent ne pas présenter une réaction positive caractéristique s'ils ne sont pas à nouveau testés 3 à 4 semaines plus tard.

b) Test de séro-agglutination rapide (TSR)

Le TSR est réalisé de la même façon, à l'exception du sérum qui remplace le sang total. Pour les tests à l'exportation un premier tri des sérums par TSR suivi de la confirmation des positifs par le test d'agglutination sur tube est une démarche optimale. Il est souhaitable de tester pour ces deux méthodes les échantillons de sérums dans les 72 h suivant le prélèvement, si l'on veut éviter les réactions non spécifiques qui augmentent avec les vieux échantillons. Les prélèvements frais peuvent être congelés pour être testés plus tard si le retard est inévitable.

c) Test d'agglutination sur tube

Le sérum frais de poulets, dindons, ou autres oiseaux est utilisé à la dilution initiale de 1/25, obtenue par le mélange de 0,04 ml de sérum avec 1,0 ml d'antigène². Dans chaque test sont inclus des sérums témoins positif et négatif. L'antigène est préparé à partir de cultures d'une souche non colorée de *S. Pullorum* ou de *S. Gallinarum* diluées à la concentration de No. 1 sur l'échelle de McFarland (tel que décrit ci-dessus). Le mélange est placé en incubation entre 37 °C et 50 °C pendant 18 à 24 h avant la lecture. Une réaction positive sera observée si un dépôt granuleux blanchâtre apparaît dans le liquide surnageant clair. La réaction négative correspond à un liquide uniformément trouble. Les échantillons positifs à la dilution 1/25 sont testés de nouveau avec une gamme de dilutions plus importantes et un titre au 1/50 est habituellement considéré comme positif bien que cette donnée puisse varier dans la littérature. Dans beaucoup de cas, on ne fait qu'une seule dilution au 1/50, mais cela peut échouer à détecter l'infection dans certains élevages si un petit nombre d'échantillons est testé.

d) Test de micro-agglutination

Ce test ressemble au test d'agglutination en tube et nécessite de petits volumes de réactifs. Ce test est pratiqué sur des plaques à microtest. Le sérum est d'abord dilué en mélangeant 10 µl de sérum à 90 µl de sérum physiologique et en ajoutant ensuite 100 µl de l'antigène coloré normalisé pour obtenir une dilution finale au 1/20. En titrant le sérum en doublant les dilutions et en ajoutant un volume égal d'antigène coloré, le titre final peut être obtenu. Les plaques sont scellées et mises en incubation à 37 °C pendant 18 à 24 ou 48 h. Lors de réaction positive, une fine précipitation sera observée alors qu'un précipité ressemblant à une pastille correspondra à une réaction négative. Cependant, des titres au 1/40 considérés habituellement comme positifs, peuvent être susceptibles de donner des résultats faussement positifs avec le sérum de dinde.

Il existe aussi d'autres épreuves sérologiques comme la micro-antiglobuline (Coombs), l'immunodiffusion, l'hémagglutination et la méthode immuno-enzymatique (ELISA).

Les techniques ELISA ont été décrites pour la recherche des anticorps dirigés contre *S. Pullorum* et *S. Gallinarum* (14). La méthode ELISA indirecte utilisant l'antigène lipopolysaccharide est probablement le test sérologique le plus sensible et le plus spécifique pour détecter *Salmonella*, dont *S. Gallinarum* et *S. Pullorum* dans les élevages. Ce test est relativement facile à réaliser sur du sérum ou du vitellus et il peut être employé pour titrer les anticorps (1, 2, 22). En pratique courante, il n'existe pas de test ELISA commercialisé pour *S. Pullorum* et *S. Gallinarum*.

2 Pour la préparation de petits volumes d'antigènes somatiques, voir le Chapitre 2.9.9., « Salmonelloses ».

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Bien que les vaccins vivants et inactivés aient été produits pour être utilisés contre *S. Gallinarum*, le vaccin le plus couramment utilisé est préparé à partir de la souche rugueuse 9R (6). Il n'a été utilisé que chez le poulet. Le nombre de bactéries viables par dose est important ; ces bactéries peuvent survivre chez les oiseaux vaccinés pendant des mois et peuvent être transmises par l'œuf (et peut-être d'oiseau à oiseau). La vaccination peut réduire les pertes dans le troupeau, mais ne prévient pas l'infection par les souches sauvages. De plus, la vaccination avec la souche 9R peut parfois provoquer une forte mortalité chez les oiseaux infectés (20), et peut stimuler la production d'anticorps transitoires. Le vaccin est administré habituellement à l'âge de 8 semaines avec un rappel à 16 semaines. Les antimicrobiens doivent être proscrits avant et après la vaccination.

Cependant, les vaccins disponibles en pratique jouent un rôle mineur dans la prévention de la typhose aviaire car ils n'entraînent qu'une protection de courte durée contre la maladie clinique ou une protection variable contre l'infection. Les auto-vaccins peuvent aussi être utilisés pour contrôler la maladie clinique. La prévention est surtout obtenue avec la mise en place de mesures de biosécurité, d'hygiène, de bonnes pratiques de production et, de la surveillance et de l'éradication des troupeaux infectés. Des vaccins 9R disponibles dans le commerce sont couramment utilisés pour réduire l'infection à *S. Enteritidis* dans les troupeaux de poules pondeuses (11).

1. Gestion des semences bactériennes

a) Caractéristiques de la semence bactérienne

Le vaccin vivant contre la typhose est une suspension de bactéries vivantes suffisamment atténuées de la souche rugueuse *S. Gallinarum*, par ex. 9R. Les bactéries vaccinales présentent les caractéristiques biochimiques de *S. Gallinarum*. Après 24 h de culture sur milieu nutritif gélosé, les colonies observées en utilisant le test de lamelles à l'acriflavine, sont rugueuses. La culture ne doit pas contenir les antigènes somatiques caractérisant les formes lisses de *S. Gallinarum*.

b) Méthode de culture

Salmonella Gallinarum peut pousser sur ou dans un milieu approprié, comme une gélose ou un milieu nutritif, pendant 24 h à 37 °C.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Il n'y a pas de méthode satisfaisante pour évaluer la protection vaccinale sur le terrain. Cependant l'expérience montre que le vaccin peut apporter un certain bénéfice dans certaines situations où les méthodes d'élevage et l'hygiène ne permettent pas de contrôler l'infection. Le test d'activité décrit ci-dessous peut permettre d'apprécier l'efficacité du vaccin.

2. Méthode de fabrication

Le vaccin peut être préparé par inoculation d'un milieu adapté, tel qu'un milieu nutritif, avec une culture fraîche de *S. Gallinarum* (9R) et une incubation à 37 °C pendant 24 h, en milieu aérobie ou anaérobie. Les organismes sont récoltés par sédimentation ou centrifugation.

Alternativement, les organismes peuvent se multiplier et être récoltés sur un milieu solide comme une gélose nutritive. Dans chaque cas la suspension est diluée dans une solution PBS à pH 7 et peut être lyophilisée. La dose utilisée par oiseau est entre 5×10^6 et 5×10^7 organismes.

3. Contrôle en cours de fabrication

Les cultures utilisées pour le contrôle des cultures de production et des cellules récoltées sont examinées au microscope après coloration de Gram pour vérifier la pureté du produit.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et l'absence de contamination par du matériel biologique sont décrits au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Six poulets âgés de 8 à 16 semaines (de préférences exempts d'organismes pathogènes spécifiques [EOPS]) sont injectés chacun par la voie sous-cutanée avec 10 doses vaccinales et sont observés pendant au moins 7 jours ; aucune réaction locale ou systémique ne doit être observée.

c) Activité

Quinze poulets sains de souche légère Sussex ou de souche Rhode Island Red, ou un croisement entre ces souches, provenant d'un troupeau indemne de *S. Pullorum*, sont inoculés chacun par la voie intrapéritonéale avec une quantité de vaccin correspondant à la dose vaccinale recommandée i.e. 5×10^7 bactéries viables. Après un intervalle de 21 à 28 jours, les poulets vaccinés et un nombre équivalent de poulets témoins non vaccinés sont privés de nourriture pendant environ 18 h. Les poulets sont ensuite testés par l'administration *per os* de 1 ml d'une suspension de milieu contenant 5×10^7 organismes d'une souche virulente de *S. Gallinarum* mélangée avec 300 mg de poudre comportant du chalk (40 %), du kaolin léger (43 %) et du trisilicate de magnésium (17 %). Tous les poulets sont observés pendant 14 à 21 jours. Le vaccin est actif si, à la fin de cette période, le nombre de poulets vaccinés survivants ne présentant pas de lésions macroscopiques de typhoïde aviaire à l'examen nécropsique, est supérieur de huit ou plus au nombre des poulets témoins malades.

d) Durée de l'immunité

Le vaccin doit fournir une protection pendant toute la période ponte et ceci peut être mesuré par des tests d'activité (efficacité) à périodes régulières pendant cette période. Le vaccin doit assurer une protection efficace pendant toute la période de ponte. Un rappel pendant la ponte peut être nécessaire, sauf chez les pondeuses dont les œufs sont destinés à la consommation humaine.

e) Stabilité

La durée de vie du vaccin peut être mesurée par l'emploi de tests d'activité à des périodes données après la fabrication. Ceci doit être réalisé sur au moins 6 prélèvements. L'activité doit rester satisfaisante pendant au moins 1 an.

f) Agents de conservation

Aucun agent de conservation n'est utilisé.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

L'agent n'est pas reconnu pathogène pour l'homme et il n'y a pas de risque particulier associé à la fabrication du vaccin ou de l'antigène. Cependant le vaccin peut favoriser un état de portage infectieux permanent chez des oiseaux asymptomatiques et provoquer la maladie chez des poulets contaminés.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Le test d'innocuité décrit dans la Section C.4.b doit être effectué sur un échantillon représentatif de chaque lot du produit final.

b) Activité

Le test d'activité décrit dans la section C.4.c doit être effectué sur un échantillon représentatif de chaque lot du produit final.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BARROW P.A. (1992). ELISAs and the serological analysis of salmonella in poultry: a review. *Epidemiol. Infect.*, **109**, 361–369.
2. BARROW P.A. (1994). Serological diagnosis of *Salmonella* serotype *enteritidis* infections in poultry by ELISA and other tests. *Int. J. Food Microbiol.*, **21**, 55–68.
3. ELLIS E.M., WILLIAMS J.E., MALLINSON E.T., SNOEYENBOS G.H. & MARTIN W.J. (1976). Culture Methods for the Detection of Animal Salmonellosis and Arizonosis. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

4. FRICKER C.R. (1987). The isolation of salmonellas and campylobacters. *J. Appl. Bacteriol.*, **63**, 99–116.
5. GAST R.K. (1997). Detecting infections of chickens with recent *Salmonella Pullorum* isolates using standard serological methods. *Poult. Sci.*, **76**, 17–23.
6. HARBOURNE J.F., WILLIAMS B.M., PARKER W.H. & FINCHAM I.H. (1963). The prevention of fowl typhoid in the field using a freeze-dried 9R vaccine. *Vet. Rec.*, **75**, 858–861.
7. HARVEY R.W.S. & PRICE T.H. (1975). Isolation of Salmonellas. Public Health Laboratory Service, London, UK.
8. HITCHNER S.B. (2004). History of biological control of poultry diseases in the U.S.A. *Avian Dis.*, **48**, 1–8.
9. HOLT P.S. & CHAUBAL L.H. (1997). Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in *Salmonella pullorum* cultures. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1016–1020.
10. ITOH Y., HIROSE K., MIYAKE M., KHAN A.Q., HASHIMOTO Y. & EZAKI T. (1997). Amplification of rfb and flic gene by polymerase chain reaction for identification and detection of *Salmonella* serovar *enteritidis*, *dublin* and *gallinarum-pullorum*. *Microbiol. Immunol.*, **41**, 791–794.
11. LEE, Y.J., MO I.P. & KANG M.S. (2005). Safety and efficacy of *Salmonella gallinarum* 9R vaccine in young laying chickens. *Avian Pathol.*, **34**, 362–366.
12. LIU G.-R., RAHN, A., LIU W.-Q., SANDERSON K.E., JOHNSTON R.N. & LIU S.-L. (2002). The evolving genome of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *J. Bacteriol.*, **184**, 2626–2633.
13. MALLINSON E.T. & SNOEYENBOS G.H. (1989). Salmonellosis. In: Isolation and Identification of Avian Pathogens, Third Edition, Purchase H.G. et al., eds. American Association of Avian Pathologists, Kendall Hunt Publishing, Iowa, USA, 3–11.
14. OLIVEIRA G.H. DE, BERCHIERI JUNIOR A., MONTASSIER H.J. & FERNANDES A.C. (2004). Assessment of serological response of chickens to *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum by Elisa. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, **6**, 111–115.
15. OLIVEIRA S.D., RODENBUSCH C.R., CE M.C., ROCHA S.L.S. & CANAL, C.W. (2003). Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.*, **36**, 217–221.
16. PARMAR D. & DAVIES R.H. (2007). Fowl typhoid in a small backyard laying flock. *Vet. Rec.*, **160**, 348.
17. PROUX K., HUMBERT F., JOUY E., HOUDAYER C., LALANDE F., OGER A. & SALVAT G. (2002). Improvements required for the detection of *Salmonella* Pullorum and Gallinarum. *Can. J. Vet. Res.*, **66**, 151–157.
18. SHAH D.H., PARK J.-H., CHO M.-R., KIM M.-C. & CHAE J.-S. (2005). Allele-specific PCR method based on rfbS sequence for distinguishing *Salmonella* Gallinarum from *Salmonella* pullorum: serotype-specific rfbS sequence polymorphism. *J. Microbiol. Methods*, **60**, 169–177.
19. SHIVAPRASAD H.L. (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **19**, 405–424.
20. SILVA E.N., SNOEYENBOS G.H., WEINACK O.M. & SMYSER C.F. (1981). Studies on the use of 9R strain *Salmonella Gallinarum* as a vaccine in chickens. *Avian Dis.*, **25**, 38–52.
21. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (1996). Auxiliary Provisions on National Poultry Improvement Plan. Code of Federal Regulations, Title 9, Part 147, 717–727.
22. WRAY C. & WRAY A. (EDS) (2000). *Salmonella* in Domestic Animals. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 407–427.

*
* *

BURSITE INFECTIEUSE (Maladie de Gumboro)

RÉSUMÉ

La bursite infectieuse aviaire (IBD) est une maladie aviaire causée par un virus appartenant au genre Avibirnavirus dans la famille des Birnaviridae. Bien que la dinde, le canard, la pintade et l'autruche puissent être occasionnellement infectés, la maladie ne s'exprime cliniquement que chez l'espèce poule. Seuls les jeunes oiseaux expriment la maladie. La forme grave et aiguë de la maladie est associée à une mortalité élevée chez les sujets âgés de 3 à 6 semaines, mais une forme moins aiguë ou subclinique est fréquente entre 0 et 3 semaines d'âge. Elle peut être à l'origine de problèmes secondaires liés à l'effet du virus sur la bourse de Fabricius. Le virus de la bursite infectieuse aviaire (IBDV) provoque une déplétion lymphoïde dans la bourse de Fabricius, qui, si elle survient au cours des deux premières semaines de vie, peut entraîner une diminution significative de l'immunité humorale et des réponses en anticorps. On reconnaît deux sérotypes d'IBDV, qui sont notés 1 et 2. Ils peuvent être différenciés par des tests de séroneutralisation (SN) croisée. Seules les souches du sérotype 1 sont pathogènes et ont été utilisées pour le développement de vaccins. Des variants antigéniques ont été décrits au sein du sérotype 1 et peuvent rendre nécessaire une adaptation du contenu antigénique des vaccins pour une protection optimale. Des souches très pathogènes de virus appartenant au sérotype 1 sont aujourd'hui très répandues dans de nombreux pays.

La maladie causée par l'infection par l'IBDV, également connue sous le nom de « maladie de Gumboro », peut en général être diagnostiquée sur la base d'une combinaison de symptômes et de lésions nécropsiques caractéristiques. La confirmation au laboratoire du diagnostic, ou le diagnostic de la forme subclinique, peuvent être réalisés par la mise en évidence d'une réponse immunitaire humorale chez des sujets non vaccinés, ou par la détection des antigènes viraux ou du génome viral dans les tissus. En l'absence de tels tests, l'examen histologique de la bourse de Fabricius peut être utile.

Identification de l'agent pathogène : *l'isolement de l'IBDV n'est en général pas pratiqué en routine au laboratoire. Des poulets dépourvus d'anticorps spécifiques peuvent être utilisés à cette fin, tout comme certaines cultures cellulaires ou des œufs embryonnés provenant de reproductrices dépourvues d'anticorps spécifiques de l'IBDV. Des difficultés peuvent être rencontrées avec les deux derniers systèmes de propagation, dans la mesure où l'IBDV ne leur est pas toujours spontanément adapté. L'identité de l'agent viral éventuellement isolé doit ensuite être confirmée par un test de SN.*

L'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) peut être mise en œuvre pour détecter les antigènes viraux dans la bourse de Fabricius : un fragment de la bourse est prélevé, homogénéisé, puis confronté comme antigène à un antiserum de spécificité connue pour l'IBDV. Cette épreuve est particulièrement utile aux phases précoces de l'infection, avant le développement d'une réponse sérologique. Une épreuve d'immunofluorescence basée sur un sérum de poulet spécifique de l'IBDV peut également être utilisée pour détecter les antigènes viraux dans le tissu bursal. Des méthodes de capture antigénique révélées par immunoadsorption à enzyme conjuguée (AC-ELISA) ont aussi été décrites pour la mise en évidence des antigènes viraux dans des homogénats de bourse de Fabricius. La technique de la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) faisant appel à des amorces nucléotidiques spécifiques de l'IBDV peut enfin être mise en œuvre pour la détection de l'ARN viral dans la bourse de Fabricius.

Caractérisation des souches virales : les souches d'IBDV peuvent être caractérisées de façon plus approfondie par i) l'étude de leur pouvoir pathogène pour des poulets dépourvus d'anticorps spécifiques de l'IBDV, ii) l'évaluation de leur réactivité antigénique dans des tests de SN croisée ou dans des épreuves faisant appel à des anticorps monoclonaux, iii) la détermination de la séquence nucléotidique de produits d'amplification obtenus par RT-PCR à partir du génome viral, ou la caractérisation de ces produits d'amplification grâce au nombre et la taille des fragments libérés après digestion de ces fragments par différentes enzymes de restriction. Plusieurs protocoles ont été publiés pour chacune de ces approches. Les épreuves devraient être conduites par des laboratoires spécialisés et devraient inclure une série de souches virales de référence à titre de témoins. Les bases moléculaires de la variation antigénique sont mieux comprises, mais il n'existe pas encore de marqueur validé pour le caractère pathogène des souches virales.

Épreuves sérologiques : les tests d'IDG, de SN ou ELISA peuvent être mis en œuvre sur les échantillons de sérum. L'infection diffuse rapidement au sein des troupeaux infectés, en conséquence il suffit de tester un faible pourcentage de l'effectif pour détecter d'éventuels anticorps. En cas de réponse sérologique positive chez des sujets non préalablement vaccinés, la totalité de l'effectif du troupeau d'origine doit être considérée comme infectée.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : des vaccins vivants à virus atténués et des vaccins adjuvés à virus inactivé sont disponibles pour le contrôle de la maladie. Un vaccin recombiné exprimant la protéine VP2 de l'IBDV a également été enregistré. Il est important que les vaccins vivants soient stables et ne présentent pas de tendance à redevenir virulent à l'occasion de leurs passages successifs d'un animal infecté à un animal sensible. Pour être efficaces, les vaccins à virus inactivés doivent avoir un contenu antigénique élevé.

Les vaccins à virus vivant sont utilisés pour induire une immunité active chez les jeunes sujets. En complément de cette approche, les jeunes poulets sont protégés passivement grâce à la vaccination des reproductrices à l'aide d'une combinaison de vaccins à virus vivant ou inactivé. La vaccination efficace des troupeaux de reproducteurs est donc d'une grande importance.

Vaccins à virus vivants : différentes souches d'IBDV atténuées sont utilisées. Les vaccins qui les incorporent sont qualifiés de « doux » (mild), « d'intermédiaires » (intermediate), ou « d'intermédiaires plus », « d'invasifs » ou de « chauds » (invasive ou hot). Les vaccins « doux » provoquent des lésions de la bourse de Fabricius très limitées, alors que les vaccins intermédiaires ou invasifs provoquent une déplétion lymphocytaire dans la bourse de Fabricius. Normalement, aucun des vaccins ne provoque une immunodépression lorsqu'il est administré à des sujets âgés de plus de 14 jours qui sont issus de reproductrices immunisées contre l'IBDV.

Les vaccins « doux » sont rarement utilisés chez le poulet de chair, mais sont largement mis en œuvre pour la primovaccination des troupeaux de reproducteurs de poulets de chair avant qu'ils ne reçoivent une vaccination de rappel effectuée par injection à l'aide d'un vaccin à virus inactivé. Les vaccins « intermédiaires » et « chauds » sont capables de mieux traverser la barrière des anticorps d'origine maternelle. Les vaccins vivants sont, en général, administrés par nébulisation ou via l'eau de boisson. En l'absence d'anticorps d'origine maternelle, les vaccins doux peuvent être administrés à l'âge de un jour. Lorsqu'ils sont présents à l'âge de 1 jour, la vaccination devrait être retardée jusqu'à ce qu'ils aient disparu chez la plupart des sujets. Le meilleur programme peut être déterminé grâce à une analyse sérologique cinétique destinée à préciser à quel moment les anticorps d'origine maternelle auront atteint un seuil suffisamment bas. Plus récemment, des vaccins vivants ont été développés afin de permettre leur administration par injection in ovo au 18^e jour d'incubation.

Vaccins à virus inactivé : ils sont le plus souvent utilisés pour induire des niveaux immunitaires élevés et homogènes chez les reproducteurs, de façon à obtenir un niveau élevé et uniforme d'anticorps d'origine maternelle chez la descendance. Les vaccins à virus inactivés peuvent également être injectés, de façon plus occasionnelle, chez des sujets jeunes de valeur et porteurs d'anticorps d'origine maternelle. Les vaccins à virus inactivés se présentent sous la forme d'une émulsion associant le vaccin et un adjuvant huileux, ils sont administrés par injection. Ils sont destinés à une utilisation chez des sujets préalablement sensibilisés soit par l'administration d'un

vaccin vivant, soit par l'exposition à un virus sauvage. La primo-exposition peut être objectivée par un contrôle sérologique avant injection. Des niveaux élevés d'anticorps d'origine maternelle peuvent être obtenus par exemple en administrant aux futurs reproducteurs un vaccin à virus vivant vers 8 semaines d'âge, suivi d'une injection de vaccin à virus inactivé vers l'âge de 18 semaines.

A. INTRODUCTION

La bursite infectieuse aviaire (IBD pour *Infectious Bursal Disease*) est causée par un virus non enveloppé, dont le génome est constitué de deux segments d'ARN bicaténaire et qui appartient au genre *Avibirnavirus* au sein de la famille des *Birnaviridae*. Bien que la dinde, le canard, la pintade et l'autruche puissent être infectés, la maladie ne s'exprime cliniquement que chez l'espèce poule. Seuls les jeunes oiseaux expriment la maladie. La forme grave et aiguë de la maladie est associée à une mortalité élevée chez les sujets âgés de 3 à 6 semaines, mais une forme moins aiguë ou subclinique est fréquente entre 0 et 3 semaines d'âge. Elle peut être à l'origine de problèmes secondaires liés à l'effet du virus sur la bourse de Fabricius. Le virus de la bursite infectieuse aviaire (IBDV) provoque une déplétion lymphoïde dans la bourse de Fabricius, qui, si elle survient au cours des deux premières semaines de vie, peut entraîner une diminution significative de l'immunité humorale et des réponses en anticorps. Deux sérotypes d'IBDV, notés 1 et 2, sont connus. Les virus de sérotype 1 peuvent provoquer la maladie chez les poulets et poulettes de moins de 10 semaines d'âge. Les sujets plus âgés ne présentent pas en général de signes cliniques. Des anticorps ont parfois été mis en évidence chez d'autres espèces aviaires, mais sans que l'infection ne s'exprime cliniquement. Les anticorps dirigés contre les virus de sérotype 2 sont très répandus chez la dinde et sont parfois mis en évidence chez le poulet ou le canard. Les infections par les IBDV de sérotype 2 n'ont donné lieu à aucun cas clinique documenté (20).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

L'isolement et l'identification de l'agent causal procurent un diagnostic de certitude de l'IBD, mais ne sont en général pas mis en œuvre en routine car le virus peut s'avérer difficile à isoler (25). En pratique, le diagnostic de laboratoire repose sur la détection des anticorps spécifiques du virus, ou sur la mise en évidence du virus dans les tissus grâce à des techniques immunologiques ou moléculaires.

1. Identification de l'agent pathogène

L'IBD cliniquement exprimée s'accompagne de symptômes et de lésions nécropsiques caractéristiques. Un troupeau affecté présentera une morbidité très élevée accompagnée d'une prostration sévère de la plupart des animaux durant 5 à 7 jours. La mortalité s'élève brusquement pendant 2 jours puis décline rapidement durant les 2 à 3 jours suivants. Habituellement, la mortalité varie de 5 à 10 %, mais elle peut atteindre 30 à 40 %. Les principaux symptômes sont une diarrhée aqueuse, des plumes ébouriffées, une mobilité réduite, de l'anorexie, des tremblements et une prostration. Les lésions observables à l'examen nécropsique incluent une déshydratation très apparente au niveau des muscles, qui présentent également de nombreuses hémorragies et ecchymoses, une hypertrophie et une décoloration des reins, avec une accumulation de cristaux d'urates dans les tubules. C'est la bourse de Fabricius qui présente les lésions essentielles pour le diagnostic : chez les sujets qui meurent en phase aiguë de l'infection, la bourse de Fabricius est hypertrophiée, turgescence, avec une décoloration jaune pâle. Des hémorragies intrafolliculaires peuvent être présentes et dans certains cas la bourse de Fabricius peut être totalement hémorragique et prendre l'aspect d'un caillot de sang (« cerise noire »). Un œdème péribursal de couleur jaune paille est présent chez de nombreux sujets. La confirmation du diagnostic, ou le diagnostic des formes subcliniques de l'infection sera de préférence entrepris à l'aide de techniques immunologiques ou moléculaires car l'IBDV est difficile à isoler. Pour l'isolement, les techniques décrites ci-après pourront être suivies. L'identification différentielle des sérotypes 1 et 2 de l'IBDV, ou celle des variants antigéniques ou pathotypiques au sein du sérotype 1, est du ressort de laboratoires spécialisés tels que les Laboratoires de référence de l'OIE pour la bursite infectieuse aviaire (se reporter à la liste dans la Partie 3 de ce *Manuel terrestre*).

a) Préparation de l'échantillon

Prélever aseptiquement la bourse de Fabricius chez environ 5 sujets malades autopsiés pendant la phase précoce de la maladie. Hacher les bourses avec deux scalpels, ajouter une petite quantité de bouillon peptoné contenant de la pénicilline et de la streptomycine (1 000 µg/ml de chaque antibiotique), et homogénéiser dans un broyeur de tissus. Centrifuger l'homogénat à 3 000 g pendant 10 min. Recueillir le surnageant qui sera utilisé pour les essais décrits ci-après. La filtration du surnageant à travers un filtre de porosité 0,22 µm peut s'avérer nécessaire pour contrôler au mieux les contaminants bactériens éventuellement présents dans la suspension virale, mais cette procédure entraîne une réduction du titre viral de la suspension.

b) Identification par immunodiffusion en gélose

Un protocole pour l'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) est décrit au paragraphe B.2.a. Pour la détection de l'antigène viral dans la bourse par IDG, les bourses doivent être prélevées aseptiquement chez environ 10 poulets présentant les symptômes de la phase aiguë de l'infection. Les bourses sont hachées à l'aide de deux scalpels actionnés comme des ciseaux, puis de petits fragments de bourse sont déposés dans les puits de la plaque de gélose, et sont confrontés à un antisérum dont la spécificité anti-IBDV est connue. Des cycles de congélation-décongélation des tissus hachés peuvent améliorer la libération des antigènes de l'IBDV par les tissus bursaux infectés et l'exsudat de congélation-décongélation peut être utilisé pour remplir les puits.

c) Identification par immunofluorescence

Des coupes ultrafines de la bourse sont préparées à l'aide d'un cryomicrotome, puis sont séchées à température ambiante et fixées dans l'acétone froide. Un antisérum spécifique de l'IBDV et marqué à la fluorescéine est déposé sur les coupes, qui sont ensuite incubées à 37 °C pendant 1 h en atmosphère humide. À la fin de la période d'incubation, les coupes sont lavées pendant 30 min à l'aide d'une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,2, puis sont rincées à l'eau distillée. Les sections sont montées sous lamelle en utilisant du glycérol tamponné à pH 7,6, puis elles sont examinées en microscopie sous lumière ultraviolette pour recherche d'une fluorescence spécifique de l'IBDV (27).

d) Identification par capture antigénique révélée par la méthode immuno-enzymatique (ac-ELISA)

Plusieurs protocoles ont été décrits pour la détection des souches d'IBDV de sérotype 1 grâce à des tests ac-ELISA (12, 19, 36). En résumé, les puits de plaques ELISA sont sensibilisés avec un anticorps anti-IBDV. Selon le protocole choisi, cet anticorps de capture peut être soit un anticorps monoclonal (AcM) murin anti-IBDV, soit un mélange de plusieurs de ces AcMs, soit un sérum post-infectieux de poulet infecté par l'IBDV. Il a été suggéré que les tests d'ac-ELISA basés sur la capture par des anticorps polyclonaux pourraient avoir une plus grande sensibilité. Les échantillons d'homogénats de bourse (voir ci-dessus) sont dilués du 1/10 au 1/25 (w/v) dans un tampon de dilution approprié, puis sont incubés dans les puits de la plaque ELISA sensibilisée. À l'issue de cette incubation, les antigènes non capturés par les anticorps sont rejetés par lavage avec un tampon approprié (tel que par exemple le PBS, pH 7,2 + 0,2 % Tween 20). Les antigènes capturés sont ensuite mis en évidence, comme dans un test ELISA indirect, avec un anticorps détecteur (qui doit avoir été produit sur une espèce animale autre que celle de l'anticorps de capture), suivi par un conjugué enzymatique spécifique de l'anticorps détecteur (dans certains protocoles, l'anticorps détecteur est directement couplé à l'enzyme), lui-même suivi par le substrat chromogène de l'enzyme. Finalement, les absorbances (ou densités optiques) – qui sont fonction de la quantité d'antigènes IBDV initialement capturée – sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre ou lecteur ELISA.

Le test ac-ELISA repose sur l'emploi d'échantillons susceptibles de contenir du virus vivant et devrait donc être mis en œuvre dans des locaux d'un niveau de confinement approprié tel qu'un poste de sécurité microbiologique de classe II. Tous les déchets liquides (tampons de lavage) et solides doivent être considérés comme contaminés par l'IBDV et décontaminés en conséquence avant élimination.

Les étapes critiques dans la mise en œuvre et l'évaluation de l'ac-ELISA consistent en i) la nécessité d'un lavage poussé entre chacune des étapes pour limiter le bruit de fond, ii) la nécessité d'inclure à titre de témoin des échantillons positif et négatif de référence dans chaque essai et iii) la nécessité que l'anticorps de capture et l'anticorps de détection réagissent tous les deux positivement avec toutes les souches virales de sérotype 1 (c'est-à-dire que ni la phase de capture, ni la phase de détection du test ne devraient être affectées de façon critique par les variations antigéniques susceptibles de survenir entre souches de sérotype 1).

e) Identification par les techniques moléculaires

Des techniques de virologie moléculaire ont été développées pour permettre de détecter l'IBDV plus rapidement que par isolement viral (8, 16, 43). La méthode moléculaire la plus utilisée est la détection du génome de l'IBDV par transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) (24, 43). Cette méthode peut détecter le génome de l'IBDV même si la souche étudiée n'est pas adaptée à la culture cellulaire, car il n'est pas nécessaire de cultiver le virus avant la RT-PCR.

Les protocoles de base pour la RT-PCR comprennent trois étapes : l'extraction des acides nucléiques à partir de l'échantillon étudié, la transcription inverse de l'ARN viral en ADNc, puis l'amplification de l'ADNc par PCR. Les deux dernières étapes exigent que l'utilisateur définisse des amorces oligonucléotidiques qui consistent en de courtes séquences complémentaires et spécifiques de la séquence nucléotidique du génome viral. Différentes régions du génome viral peuvent être amplifiées selon la position dans le génome des amorces qui ont été sélectionnées. Les exemples ci-dessous permettent l'amplification dans l'un des

segments génomiques du virus (segment A) du tiers moyen du gène codant la protéine de capsid externe VP2 (9, 10).

- **Extraction des acides nucléiques**

L'ARN simple brin est extrêmement sensible à la dégradation par les RNAses. Le génome de l'IBDV constitué d'ARN double brin résiste à la dégradation par les RNAses. Toutefois, les cellules infectées contiennent aussi des ARN simple brin de polarité positive dérivés du génome de l'IBDV, qui pourraient être utilisés comme matrice dans l'étape de RT et contribuer ainsi à améliorer la sensibilité de l'épreuve. Il est donc important que l'extraction d'ARN soit réalisée par un personnel muni de gants et utilisant des réactifs et du matériel de laboratoire non contaminés par les RNAses.

L'ARN de l'IBDV peut être extrait des tissus infectés à l'aide de kits de diagnostic commercialisés par les producteurs de réactifs pour la biologie moléculaire. Le protocole suivant est une alternative : ajouter 1 % (poids/volume de concentration finale) de SDS (sodium dodecyl sulphate) et 1 mg/ml de protéinase K à 700 µl de suspension virale (par exemple un homogénat bursal). Incuber pendant 60 min à 37 °C. Les acides nucléiques sont ensuite obtenus en suivant un protocole normalisé d'extraction au phénol/chloroforme (attention : le phénol est toxique et devrait être manipulé et éliminé en conséquence). Les acides nucléiques sont recueillis à partir de la dernière phase aqueuse, par précipitation à l'éthanol, et sont remis en suspension dans de l'eau distillée ou un tampon approprié dépourvu de RNase. Jusqu'à utilisation, les ARN en solution dans l'eau doivent être conservés congelés à une température inférieure à -20 °C.

- **Transcription inverse**

Plusieurs transcriptases inverses sont disponibles chez des fournisseurs commerciaux. Suivre les recommandations du fournisseur pour préparer le mélange réactionnel. Utiliser l'amorce « antisens » (complémentaire du brin positif du génome de l'IBDV, voir ci-après) à l'étape de transcription inverse, dans la mesure où cela permet la synthèse d'un ADN complémentaire à la fois à partir du brin positif du génome viral et à partir des ARN simples brins de polarité positive également contenus dans les cellules infectées. Une autre solution consiste à utiliser des amorces au hasard (hexanucléotides) pour démarrer la synthèse de l'ADNc,

La matrice ARN issue de l'IBDV doit être dénaturée avant d'être ajoutée au mélange réactionnel de RT. Ajouter 1 volume de diméthylsulfoxyde (de niveau de pureté « biologie moléculaire ») à 4 volumes de la solution d'ARN viral préalablement décongelée. Chauffer pendant 3 min à 92 °C et refroidir rapidement sur la glace ; une autre méthode possible consiste à chauffer pendant 5 min puis à refroidir immédiatement le mélange par trempage dans l'azote liquide. Transférer le volume requis de matrice dénaturée dans le mélange de RT. Incuber selon les recommandations du fournisseur de l'enzyme.

La solution d'ADNc obtenue à l'issue de l'étape de RT devrait être conservée congelée à une température inférieure à -20 °C. Différer de plusieurs semaines l'analyse par PCR peut être à l'origine de l'obtention de résultats de PCR faussement négatifs.

- **Amplification en chaîne par polymérase**

Différentes ADN polymérases utilisables en PCR sont disponibles commercialement. Suivre les recommandations du fournisseur pour préparer le mélange réactionnel de PCR. Les protocoles pour l'amplification et le typage moléculaire de l'IBDV ont récemment été abordés (44). Ainsi par exemple, les paires d'amorces pour PCR présentées ci-dessous, U3/L3 d'une part et +290/-861 d'autre part, peuvent être proposées car elles se sont révélées utiles pour amplifier respectivement le tiers central du gène de la VP2 dans le segment A du sérotype 1 (9, 10), et une région à l'extrémité 5' du segment B (21). Les deux régions conviennent bien aux études d'épidémiologie moléculaire (22). Bien qu'un certain nombre des souches de l'IBDV aient deux modifications de nucléotides respectivement en positions 35 (G-A) et 38 (T-C) par rapport à l'amorce U3 (y compris les isolats en provenance du Japon [OKYM], Hong Kong [HK46], Royaume Uni [UK661] et Nigeria [N4]), il a été démontré que la paire d'amorces U3-L3 amplifie avec succès certains des virus qui présentent les deux mutations. Cela est vraisemblablement dû au fait que l'extrémité 3' de U3 est fortement conservée. Cependant, comme pour la plupart des épreuves de PCR, il peut exister des souches d'IBDV présentant des modifications nucléotidiques dans les régions d'appariement des amorces, ce qui peut nécessiter l'utilisation d'autres amorces pour optimiser la détection par RT-PCR.

L'association de protocoles de RT-PCR ciblant le segment A et le segment B augmente la probabilité de détecter l'IBDV sérotype 1 quand il est présent ; elle permet aussi une caractérisation génétique poussée des souches d'IBDV détectées.

Séquences nucléotidiques des amorces U3 et L3 (spécifiques pour le segment A, gène de la VP2) :

Sens U3 : 5'-**TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT**-GCA-TGC-GGT-ATG-TGA-GGC-TTG-GTG-AC-3'

Antisens : 5'-**CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC**-GAA-TTC-GAT-CCT-GTT-GCC-ACT-CTT-TC-3'

Séquences nucléotidiques des amorces +226 et -793 (spécifiques pour le segment B, gène de la VP1) :

Sens +290 : 5'-**TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT**-GAA-TTC-AGA-TTC-TGC-AGC-CAC-GGT-CTC-T-3'

Antisens -861 : 5'-**CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC**-CTG-CAG-TTG-ATG-ACT-TGA-GGT-TGA-TTT-TG-3'

Les amorces oligonucléotidiques U3 et L3 comprennent toutes les deux 44 nucléotides, alors que les amorces +290 et -861 comprennent respectivement 46 et 47 nucléotides. Les quatre amorces comportent une extrémité 3' spécifique de l'IBDV, indiquée en italiques dans les séquences ci-dessus. Les portions spécifiques de l'IBDV correspondent aux positions nucléotidiques 657 à 676 et 1193 à 1212 du segment A de l'IBDV, pour les amorces U3 et L3 (numérotation des positions nucléotidiques comme dans le segment A de la souche P2, Acc No X84034), et aux positions nucléotidiques 290 à 311 et 861 à 883 du segment B de l'IBDV pour les amorces +290 et -861 (numérotation des positions nucléotidiques comme dans le segment B de la souche D6948, Acc No AF240687). La séquence spécifique de l'IBDV est couplée à une séquence non-IBDV localisée à l'extrémité 5' de l'amorce (en caractère gras ou souligné dans les séquences ci-dessus). Cette séquence non-IBDV correspond à l'amorce universelle M13 dans les amorces sens ou M13 inverse (RM13) dans les amorces antisens. Les amorces universelles M13 et RM13 sont couramment utilisées comme amorces dans les réactions de séquençage de l'ADN, de sorte que les produits d'amplification obtenus avec les amorces U3/L3 et +290/-861, une fois purifiés, peuvent être facilement séquencés dans les deux sens. Enfin, des sites de restriction (soulignés dans les séquences ci-dessus) sont inclus pour les endonucléases de restriction suivantes : *Sph*I (dans l'amorce U3), *Eco*RI (dans les amorces L3 et +290), et *Pst*I (dans l'amorce -861). Ces sites de restriction sont positionnés dans les amorces de façon à ce que les produits d'amplifications obtenus avec les paires U3/L3 ou +290/-861 puissent être clonés si nécessaire. La paire d'amorces U3/L3 génère un produit d'amplification de 604 paires de bases, dont 516 pb sont spécifiques de la séquence amplifiée et incluent la région codant le domaine hypervariable de la protéine VP2. La paire d'amorces +290/-861 génère un produit de 642 pb, dont 549 pb sont spécifiques de la séquence amplifiée. Les deux produits sont dérivés de régions génomiques qui conviennent pour l'analyse phylogénétique (9, 10, 21, 22).

Réaliser une étape de dénaturation initiale comme recommandé par le fournisseur de l'ADN polymérase, suivie de 35 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation, une étape d'appariement et une étape d'élongation. Dans ces cycles, une dénaturation à 95 °C pendant 30 s et un appariement à 64 °C pendant 45 s peuvent être utilisés avec les deux paires d'amorces U3/L3 et +290/-861 (la température d'appariement devra être adaptée si d'autres amorces sont utilisées). Les paramètres de l'étape d'élongation devraient être définis selon les recommandations du fournisseur de l'ADN polymérase.

La réaction peut être révélée par électrophorèse des produits d'amplification et de marqueurs de taille des fragments ADN dans un gel à 1 % d'agarose, coloré au bromure d'éthidium (Attention : le bromure d'éthidium est toxique et cancérigène. Il devrait être manipulé et éliminé en conséquence).

Trois réactions de PCR devraient être réalisées pour chaque échantillon d'ADNc (pur, dilué au 1/10 et dilué au 1/100) pour éviter des résultats faussement négatifs liés à l'inhibition de la réaction PCR du fait de quantités trop importantes d'ADNc dans le mélange réactionnel.

Chaque réaction PCR devrait inclure des réactions témoins positive et négative. Des protocoles incluant un témoin interne destiné à objectiver la présence d'inhibiteurs de la PCR dans l'échantillon testé ont été proposés (35).

Différer la réaction PCR pendant plusieurs semaines après l'étape de RT peut conduire à obtenir des résultats PCR faussement négatifs.

f) Isolement viral en culture cellulaire

Inoculer 0,5 ml de l'échantillon sur chacune des quatre cultures de fibroblastes embryonnaires de poulet (CEF pour *Chicken Embryo Fibroblast*) récemment parvenues à confluence du tapis cellulaire et préparées à partir d'œufs embryonnés exempts d'agents pathogènes spécifiques (EAPS), dans des flacons de 25 cm². Après 30 à 60 min d'adsorption à 37 °C, laver les tapis cellulaires 2 fois à l'aide de solution tamponnée au sel d'Earle et ajouter du milieu de survie dans chaque flacon. Incuber les cultures à 37 °C en observant quotidiennement jusqu'à apparition de l'effet cytopathogène (ECP). Celui-ci se caractérise par l'apparition de petites cellules rondes et réfringentes. Si aucun ECP n'est observé après une période d'incubation de 6 jours, rejeter le milieu de culture, puis congeler et décongeler les tapis cellulaires et réinoculer le lysat obtenu à des cultures cellulaires fraîches. Ce protocole peut devoir être répété au moins 3 fois. Si un ECP

est observé, il convient de confronter le virus à un antiserum spécifique de l'IBDV dans un test de séroneutralisation virale révélée sur culture de cellules (voir ci-après). Les souches d'IBDV les plus pathogènes ne peuvent en général être adaptées à la culture en CEF, à moins que le virus ait d'abord été soumis à un nombre important de passages en série sur œuf embryonné (voir ci-dessous).

g) Isolement viral sur œuf embryonné

Inoculer 0,2 ml d'échantillon par voie intravitelline à cinq œufs de poule embryonnés, dépourvus d'anticorps spécifiques et âgés de 6 à 8 jours, et par voie chorio-allantoïdienne (1) à cinq autres œufs de poule embryonnés dépourvus d'anticorps spécifiques et âgés de 9 à 11 jours. Les embryons dépourvus d'anticorps spécifiques peuvent être obtenus à partir de troupeaux dont la séronégativité vis-à-vis de l'IBDV a été démontrée. Mirer chaque jour et rejeter les embryons morts dans les 48 h suivant l'inoculation. Les lésions embryonnaires sont recherchées chez les embryons qui meurent ensuite. Les souches d'IBDV de sérotype 1 produisent un nanisme de l'embryon, un œdème sous-cutané, une congestion et des hémorragies sous cutanées ou intra-crâniennes. Le foie est habituellement hypertrophié, avec des tâches de congestion lui donnant un aspect marbré. En cas de mort tardive, le foie peut être hypertrophié et verdâtre, avec des zones de nécrose. Le volume de la rate est augmenté et les reins sont hypertrophiés et congestifs, d'aspect marbrés. Lorsque des lésions embryonnaires sont présentes, le virus devrait alors être confronté à un antiserum spécifique de l'IBDV dans un test de SN révélé sur œuf embryonné.

Les souches d'IBDV de sérotype 1 provoquent en général la mort d'au moins quelques-uns des œufs inoculés au premier passage.

Les souches d'IBDV de sérotype 2 ne provoquent ni œdème sous-cutané ni hémorragies chez les embryons infectés, qui apparaissent au contraire de taille réduite et présentent une décoloration jaune pâle.

Pour la préparation de stock virus propagés sur œufs embryonnés ou avant réalisation d'un nouveau passage viral sur embryon, les embryons lésés ou dont l'infection est suspectée sont prélevés de façon stérile. Leur tête et leurs membres sont rejetés et leur corps est ensuite broyé comme décrit à la section B.1.a pour la préparation d'une suspension virale.

h) Isolement du virus chez le poulet

Cette méthode a été utilisée dans le passé mais n'est plus recommandée compte-tenu des impératifs de respect du bien-être animal. Cinq poulets sensibles (âgés de 3 à 7 semaines) et trois poulets de même âge présentant des anticorps contre l'IBDV sont inoculés par administration d'une goutte dans l'œil avec 0,05 ml d'échantillon. Les poulets sont euthanasiés 72 à 80 h après inoculation, et les bourses de Fabricius sont examinées. Les bourses de Fabricius des poulets infectés avec les souches pathogènes d'IBDV de sérotype 1 apparaissent jaunâtres et oedématisées (parfois hémorragiques), leurs stries sont très apparentes. Un œdème est parfois présent autour de la bourse, et des amas durcis de caséum sont parfois trouvés dans la bourse. Les plis de la bourse présentent des pétéchies.

La présence de lésions de la bourse chez les sujets sensibles, accompagnée de l'absence de lésions chez les sujets immunisés assure le diagnostic de l'IBD. Les bourses de Fabricius prélevées chez les sujets des deux groupes peuvent être utilisées comme antigènes dans une épreuve d'IDG, dans lequel elles seront confrontées à un antiserum monospécifique de l'IBDV (voir Section B.1.b).

L'importance des lésions de la bourse peut varier considérablement avec le pouvoir pathogène de la souche d'IBDV étudiée. Néanmoins, comme les échantillons soumis pour l'isolement viral sont susceptibles de varier dans leur titre viral, la sévérité des lésions bursales observées à l'étape de l'isolement viral ne donne que des renseignements limités sur le pouvoir pathogène de la souche étudiée.

Les bourses de Fabricius des poulets infectés par les souches d'IBDV appartenant au sérotype 2 ne présentent pas de lésions macroscopiques.

i) Identification des souches virales

Les souches d'IBDV peuvent être caractérisées plus avant en évaluant leur pouvoir pathogène chez des poulets sensibles, en caractérisant leur réactivité antigénique dans des tests de SN croisée ou à l'aide d'anticorps monoclonaux, enfin en déterminant leur séquence nucléotidique à partir des produits d'amplification obtenus par RT-PCR, ou en étudiant le polymorphisme des fragments de restriction obtenus après digestion de ces produits d'amplification à l'aide d'endonucléases de restriction. Différents protocoles ont été décrits pour chacune de ces approches. De tels tests devraient être conduits par des laboratoires spécialisés et devraient inclure une série de souches virales de référence à titre de témoins. Bien que les bases moléculaires de la variation antigénique soient maintenant mieux comprises, il n'existe pas encore de marqueur de virulence validé.

- **Étude du pouvoir pathogène**

Les études destinées à comparer le pouvoir pathogène des souches d'IBDV doivent être réalisées dans des locaux expérimentaux confinés de façon à ne pas disséminer le virus étudié (voir Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries », concernant les échanges internationaux et le confinement au laboratoire des agents pathogènes pour les animaux). Des poulets SAN ayant un statut microbiologique connu (idéalement des poulets EAPS) doivent être utilisés pour éviter des interférences dues à d'autres agents contaminants.

Les principales variables à prendre en compte lors de la comparaison des essais destinés à mesurer le pouvoir pathogène sont la souche, l'âge et le statut immunitaire des poulets éprouvés, la dose et la voie d'inoculation du virus d'épreuve et la présence d'éventuels agents contaminants dans l'inoculum. Les souches légères de poule pondeuse ont été décrites comme étant plus sensibles que les races plus lourdes utilisées pour la production du poulet de chair (42). Des différences de sensibilité peuvent aussi être observées entre différentes lignées de poulets EAPS. Le poulet présente une sensibilité maximale à l'IBD entre 3 et 6 semaines d'âge (25) (L'influence du statut immunitaire est décrite à la Section C). Une dose de virus d'épreuve élevée, telle que celle décrite à la Section C.1.c, est nécessaire de façon à ce que les poulets inoculés se contaminent tous simultanément sans qu'un passage du virus d'oiseau à oiseau soit nécessaire. Enfin, la présence dans l'inoculum d'agents contaminants, tels que les adénovirus ou le virus de l'anémie infectieuse aviaire, peut modifier la sévérité de l'IBD et la nature des symptômes observés après l'épreuve (32).

Les qualificatifs de « variant », « classique » ou « hypervirulent » ont été utilisés pour décrire des souches d'IBDV présentant différents niveaux de pouvoir pathogène. Sur la base des symptômes et lésions observés chez deux lignées génétiques de poulets EAPS de souche White Leghorn après épreuve à l'aide de 10^5 doses de virus infectant 50 % des embryons (DIE_{50}), les « variants » nord-américains n'induisent que peu ou pas de signes cliniques et pas de mortalité, mais des lésions de la bourse marquées, les IBDV « classiques » induisent environ 10 à 50 % de mortalité avec des symptômes et lésions typiques, alors que les IBDV « hypervirulents » induisent environ 50 à 100 % de mortalité avec des signes et lésions typiques (Eterradossi *et al.*, observation personnelle).

- **Étude de l'antigénicité**

Les parentés antigéniques entre souches d'IBDV peuvent être étudiées par des tests de SN croisée, qui présentent la meilleure corrélation avec la protection croisée. Ces tests doivent être pratiqués en utilisant des œufs embryonnés SAN quand les virus étudiés ne peuvent être cultivés en CEF (c'est par exemple le cas des IBDV hypervirulents [vvIBDV]). Des différences dans les réponses en SN croisée des souches d'IBDV de sérotype 1 ont conduit à définir des sous-types au sein du sérotype 1, certains de ces sous-types incluant les souches d'IBDV nord-américaines antigéniquement « variantes » (15).

Une autre approche dans l'étude des parentés antigéniques consiste en l'utilisation d'AcMs murins qui se lient aux épitopes de l'IBDV en neutralisant le virus. Plusieurs collections d'AcM existent dans le monde (12, 13, 37). Certains AcMs ont été inclus dans des kits de diagnostic commercialement disponibles, mais une collection unifiée de référence n'a pas encore été proposée. Tous les épitopes de l'IBDV permettant la neutralisation virale décrits jusqu'à présent ont été cartographiés dans un domaine immunogène principal constitué par le tiers moyen (acides aminés 200 à 340) de la protéine de capsid externe VP2 (10, 33, 40). Cette région est qualifiée de « domaine variable de VP2 » (vVP2) car la plupart des changements aminopeptidiques observés entre souches d'IBDV y sont regroupés. Au sein de VP2, quatre séries d'acides aminés critiques pour l'antigénicité sont désignées comme les « pics hydrophiles de VP2 ». Ce sont les positions aminopeptidiques 210 à 225 (pic majeur A), 249 à 252 (pic mineur 1), 281 à 292 (pic mineur 2) et 313 à 324 (pic majeur B) (2, 41). Les souches d'IBDV nord-américaines antigéniquement « variantes » et « hypervirulentes » présentent au niveau de ces positions des mutations aminopeptidiques corrélées avec les variations des épitopes neutralisants (9, 40). À ce jour, aucun marqueur antigénique ne s'est avéré strictement corrélé au pouvoir pathogène de l'IBDV.

- **Identification moléculaire**

L'essentiel des efforts de caractérisation moléculaire a été focalisé sur la caractérisation du plus grand segment génomique de l'IBDV (segment A) et tout particulièrement de la région codant vVP2. Plusieurs protocoles ont été publiés pour la caractérisation des produits d'amplification à l'aide d'endonucléases de restriction. Ces approches sont désignées sous les acronymes RT-PCR/RE ou RT-PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – polymorphisme de longueur des fragments de restriction) (17, 24, 46). L'utilité de l'information qu'ils procurent dépend de l'identification d'enzymes de restriction coupant dans des zones du génome ayant une signification pour le phénotype viral. Certains sites impliqués dans l'antigénicité ont été identifiés (voir ci-dessus), mais des sites de restriction liés de façon fiable à la virulence restent à identifier et à valider. Le séquençage nucléotidique des produits d'amplification obtenus par RT-PCR, bien que plus coûteux que la restriction enzymatique, propose une approche permettant d'apprécier plus

précisément les parentés génétiques entre les souches d'IBDV. Des marqueurs ont été identifiés expérimentalement, à l'aide d'une approche par génétique inverse, qui permettent de reconnaître les souches d'IBDV adaptées à la culture cellulaire, lesquelles présentent les paires d'acides aminés 279 N-284 T (23) ou 253 H-284 T (28). Chez la plupart des IBDV « hypervirulents », quatre acides aminés typiques sont présents (222 A, 256 I, 294 I et 299 S) (3, 9, 24). Toutefois, il n'est pas encore établi si ces acides aminés jouent un rôle dans la virulence ou s'ils constituent seulement une indication de l'origine clonale de la plupart des vvIBDV. Plusieurs études récentes suggèrent que bien que VP2 soit un facteur de virulence important, cette protéine pourrait ne pas être le seul (4). Il a été décrit que les segments génomiques A et B de l'IBDV co-évoluent principalement (c'est-à-dire que la plupart des groupes de souches phylogénétiquement significatifs, dont les souches apparentées aux vvIBDV, peuvent être identifiées par l'analyse de leurs deux segments génomiques), mais des virus potentiellement réassortants ont été identifiés (21).

2. Épreuves sérologiques

a) Épreuve d'immunodiffusion en gélose

L'IDG est la plus utile des épreuves sérologiques pour détecter les anticorps spécifiques dans le sérum, ou pour détecter les antigènes viraux ou les anticorps dans les tissus de la bourse de Fabricius.

Les prélèvements sanguins devraient être réalisés tôt lors de l'apparition de la maladie et le prélèvement devrait être répété 3 semaines plus tard. Le virus diffusant rapidement, il suffit de prélever une faible proportion des animaux au sein d'un troupeau. Habituellement 20 prises de sang suffisent. Pour la recherche de l'antigène viral dans la bourse de Fabricius, les bourses devraient être prélevées stérilement sur environ dix poulets en phase aiguë de l'infection. Les bourses sont hachées à l'aide de deux scalpels avec des mouvements de ciseaux, puis de petits fragments de tissus sont déposés dans les puits de la plaque de gélose et sont confrontés à un antiserum de positivité connue vis-à-vis de l'IBDV. Des cycles de congélation/décongélation des tissus hachés peuvent améliorer le relargage des antigènes de l'IBDV à partir des tissus bursaux infectés.

- **Préparation de l'antigène positif de référence**

Inoculer des poulets sensibles âgés de 3 à 5 semaines, par gouttes dans l'œil, avec une suspension clarifiée d'homogénat bursal (10 % poids/vol) connue pour contenir des particules viables d'IBDV¹. Euthanasier les poulets 3 jours après inoculation et récolter les bourses stérilement. Rejeter les bourses hémorragiques et mélanger les autres, peser et ajouter un volume équivalent d'eau distillée froide (ou d'un tampon approprié tel que du PBS ou un bouillon tryptose phosphate) et un volume équivalent de chlorure de méthylène non dilué (Attention : le chlorure de méthylène est toxique et suspecté d'être cancérigène. Il devrait être manipulé et éliminé en conséquence. Une alternative possible permettant d'éviter les risques pour la santé du manipulateur est d'utiliser du trichlorotrifluoroéthane). Homogénéiser soigneusement le mélange dans un broyeur de tissus et centrifuger à 2 000 *g* pendant 30 min. Récolter le surnageant et répartir en aliquots pour stockage à -40 °C. L'antigène contient du virus vivant et ne devrait être manipulé que dans des locaux de niveau de confinement approprié, comme par exemple une enceinte de sécurité microbiologique de classe II. Si nécessaire, l'antigène peut être inactivé avant d'être réparti : ajouter 0,3 % (vol/vol) de β -propiolactone au surnageant récolté à l'issue de la centrifugation, et incubé 2 h supplémentaires à 37 °C. Il est important que cette incubation ait lieu sur un agitateur orbital ou un mélangeur rotatif, de façon à ce que la β propiolactone accède à toutes les surfaces internes du récipient qui ont été au contact du virus vivant. Répartir et stocker comme ci-dessus. Contrôler l'efficacité du processus d'inactivation en essayant de réisoler l'IBDV à partir de l'antigène inactivé, par trois passages sériés sur œuf embryonné (voir paragraphe B 1 g).

- **Préparation du sérum témoin positif**

Inoculer des poulets sensibles âgés de 4 à 5 semaines, par gouttes dans l'œil, avec 0,05 ml d'une suspension clarifiée d'homogénat bursal (10 % poids/vol) connue pour contenir des particules viables d'IBDV¹. Saigner les animaux 28 jours après inoculation. Mélanger les sérums, répartir et stocker les aliquots à -20 °C.

- **Préparation de la gélose**

Dissoudre du chlorure de sodium (80 g) et du phénol (5 g) dans de l'eau distillée (1 litre) (attention : le phénol est toxique et devrait être manipulé et éliminé en conséquence). Ajouter l'agar (12,5 g) et chauffer jusqu'à dissolution complète de l'agar. Afin d'éviter l'utilisation du phénol, qui est à l'origine d'un risque pour

¹ La souche classique d'IBDV 52/70 (sérotipe 1, pathotype classique) est appropriée et peut être obtenue auprès de l'un des Laboratoires de référence de l'OIE (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*).

la santé du manipulateur et pour l'environnement, une autre recette pouvant être utilisée pour la préparation de la gélose est la suivante : chlorure de sodium (80 g), dihydrogénophosphate de potassium (0,45 g), hydrogénophosphate de sodium dihydrate (1,19 g), agar (10 g) et eau distillée qsp 1 litre (pH final = 7,1 entre 20 et 25 °C). Cette recette peut être homogénéisée par chauffage à 90 °C sous agitation. Pendant que le mélange est encore très chaud, filtrer à travers un tampon de bourre de cellulose enveloppé de quelques couches de gaze et répartir sous 20 ml en bouteilles de verre. Le milieu sans phénol peut être stérilisé à l'autoclave à (au plus) 115 °C pendant 15 min. Stocker les bouteilles à 4 °C jusqu'à utilisation.

• **Protocole**

- i) Préparer les plaques de géloses au moins 24 h et au plus 7 jours avant utilisation. Faire fondre la gélose en chauffant les bouteilles à la vapeur ou au bain-marie bouillant. Prendre soin que l'eau ne puisse entrer dans les bouteilles.
- ii) Verser le contenu d'une bouteille dans chacune des boîtes de Petri de diamètre 9 cm, placées sur une surface horizontale. Préparer autant de boîtes de Petri que nécessaire. Certains laboratoires préparent la gélose sur des lames de verre pour microscopie (25 × 75 mm, la gélose devant avoir 3 mm d'épaisseur).

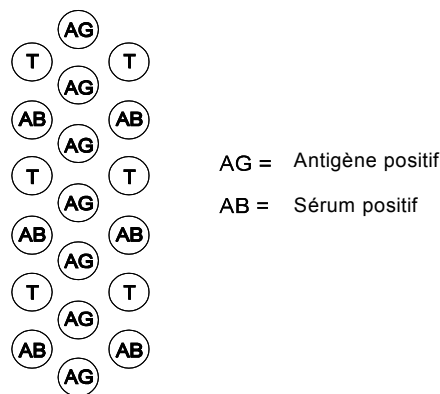


Fig. 1. Position des puits pour recherche d'anticorps (T = sérums à tester)

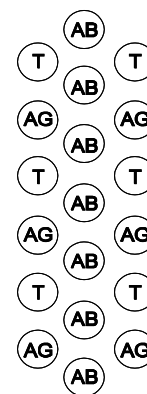


Fig. 2 Position des puits pour recherche d'antigènes (T = tissus à tester)

Notes :

1. Une disposition en ligne des puits est préférable mais une disposition hexagonale peut aussi être utilisée. Chaque sérum ou fragment de bourse de Fabricius testé devrait être déposé dans un puits, selon le cas, soit adjacent à un autre puits contenant le sérum positif de référence (AB), soit adjacent à un autre puits contenant l'antigène positif de référence (AG).
2. Les puits utilisés sont profonds de 3 mm, ont un diamètre de 6 mm et sont séparés par une distance de 3 mm (d'autres dimensions dont on aurait préalablement démontré l'efficacité peuvent être utilisées).

- iii) Couvrir les plaques et laisser la gélose solidifier, puis stocker à 4 °C pendant au plus 7 jours (Si les boîtes doivent être utilisées le jour même où elles sont coulées, les sécher en les plaçant ouvertes mais retournées pendant 30 min à 1 h dans une étuve à 37 °C).
- iv) Découper trois rangées verticales de puits d'un diamètre de 6 mm, séparés les uns des autres par un espace de 3 mm, à l'aide d'un emporte pièce et d'un schéma permettant de repérer la disposition des puits.
- v) Enlever le bouchon de gélose des puits avec une pompe à vide, ou avec une plume d'acier montée, en prenant garde de ne pas endommager les parois des puits.
- vi) Avec une pipette, distribuer 50 µl des sérums à tester dans les puits comme indiqué à la Figure 1.

Ou pour la détection des antigènes de l'IBDV dans les tissus bursaux.

Déposer dans les puits, à l'aide de pinces bruxelles à mors recourbés, de petits fragments de tissus finement hachés, comme indiqué à la Figure 2, de sorte que les puits soient exactement remplis. L'exsudat de congélation-décongélation des tissus hachés peut aussi être utilisé pour remplir les puits.

- vii) Distribuer 50 µl des réactifs témoins positif et négatif dans les puits appropriés.

- viii) Incuber les boîtes entre 22 et 37 °C pendant au plus 48 h, en chambre humide pour éviter le dessèchement de la gélose.
- ix) Examiner les boîtes après 24 et 48 h, au dessus d'un fond sombre, en utilisant une source lumineuse oblique.

- **Variante quantitative de l'épreuve d'immunodiffusion en gélose**

L'épreuve d'IDG peut aussi être utilisée pour mesurer les niveaux immunitaires en utilisant des dilutions sériques dans les puits et en définissant le titre comme la plus forte dilution produisant une ligne de précipité (5). Cette approche peut être très utile pour mesurer les anticorps maternels ou vaccinaux et pour décider de la date optimale pour la vaccination, cette variante quantitative de l'épreuve d'IDG a maintenant été largement remplacée par l'utilisation de test ELISA.

b) Les tests de séroneutralisation virale

Le test de SN est réalisé en culture cellulaire. Le test est plus compliqué et plus coûteux que l'épreuve IDG, mais il est plus sensible pour détecter les anticorps. Cette sensibilité n'est pas nécessaire pour le diagnostic de routine, mais peut s'avérer utile pour évaluer les réponses vaccinales ou pour différencier les réponses immunitaires induites par les sérotypes 1 et 2 de l'IBDV.

Tout d'abord, une suspension virale est préparée dans du milieu de culture cellulaire et son titre est ajusté de façon à contenir 100 DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) sous 0,05 ml (Spearman-Kärber [1] ou Reed & Muench [30]). Cette suspension est distribuée à raison de 0,05 ml dans chaque puits d'une microplaque de qualité adaptée à la culture cellulaire. Les sérums à tester sont inactivés par chauffage à 56 °C pendant 30 min. Des dilutions sériées de 1/2 en 1/2 des sérums à tester sont préparées dans la suspension virale diluée. Après 30 min à température ambiante, 0,2 ml d'une suspension de fibroblastes d'embryons de poulets EAPS sont ajoutés à chaque puits. La densité de cette suspension cellulaire doit être suffisante pour que des tapis cellulaires confluent soient obtenus après 24 h d'incubation. Les plaques sont scellées et incubées à 37 °C pendant 4 à 5 jours, période à l'issue de laquelle les tapis cellulaires sont observés au microscope pour mise en évidence de l'ECP caractéristique de l'IBDV. La dilution limite (ou titre sérique) est exprimée comme la réciproque de la plus forte dilution virale n'ayant pas permis de détecter l'ECP. Pour limiter les variations liées à la réalisation de tests successifs ou à des manipulateurs différents, un sérum de référence de titre neutralisant connu peut être inclus dans chaque série de tests² et le titre de la suspension virale doit être déterminé à chaque nouvelle manipulation en utilisant un nombre de puits suffisant pour chaque dilution virale.

c) Méthodes immuno-enzymatiques

Les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) sont utilisées pour la détection des anticorps induits par l'IBDV. La sensibilisation des plaques requiert une préparation virale purifiée, ou pour le moins semi-purifiée, ce qui nécessite des soins et des techniques particuliers. Les méthodes pour la préparation des réactifs et la mise en œuvre de l'épreuve ont été décrites par Marquardt *et al.* en 1980 (26). Des kits de diagnostic commerciaux sont disponibles.

Les sérums à tester sont dilués selon le protocole pré-établi ou le mode d'emploi du kit de diagnostic utilisée, et chaque sérum est déposé dans le nombre requis de puits. Après incubation dans les conditions appropriées, les sérums sont rejetés des plaques et les puits sont soigneusement lavés. Des anticorps anti-poulet couplés à une enzyme sont distribués dans les puits et les plaques sont à nouveau incubées dans les conditions appropriées. Les plaques sont vidées et lavées à nouveau avant que soit ajouté dans les puits de la plaque un substrat chromogène qui provoque un changement de couleur en présence de l'enzyme. À l'issue de l'étape finale d'incubation, la réaction du substrat chromogène est arrêtée par addition d'une solution de blocage appropriée et l'intensité des réactions colorées est quantifiée par la mesure de l'absorbance (densité optique) de chaque puits. Un ratio entre l'échantillon testé et le positif de référence (S/P) est calculé pour chaque échantillon.

d) Interprétation des résultats

L'épreuve d'IDG est étonnamment sensible, quoique moins sensible que le test de SN. Ce dernier produira souvent un titre neutralisant alors que l'épreuve d'IDG sera négative. Les réactions sérologiques positives chez des sujets non vaccinés et dépourvus d'anticorps d'origine maternelle indiquent une infection. À titre indicatif, une réaction positive dans l'épreuve d'IDG chez un sujet vacciné ou chez un jeune sujet porteur d'anticorps d'origine maternelle indique un niveau d'anticorps protecteurs. Les tests ELISA donnent des résultats plus rapides que les tests de SN et d'IDG, et sont moins coûteuses en termes de travail, bien que

² Un antisérum approprié peut être obtenu auprès de l'un des Laboratoires de référence de l'OIE (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*).

les réactifs soient plus chers à l'achat. Les titres SN et IDG sont bien corrélés mais la SN est plus sensible et les titres IDG sont proportionnellement plus faibles. La corrélation entre l'ELISA et la SN, ou entre l'ELISA et l'IDG est plus variable et dépend de l'origine des réactifs ELISA. Lorsque l'on étudie la décroissance des anticorps d'origine maternelle, il n'est pas inhabituel de détecter des anticorps résiduels par SN à un âge auquel les résultats ELISA sont déjà négatifs. Une formule a été développée pour le calcul de l'âge optimal de vaccination (qui variera selon le vaccin utilisé) en fonction des titres ELISA (18). Des réactions positives non spécifiques peuvent être observées avec la plupart des tests ELISA car ceux-ci sont en général conçus pour suivre les réponses post vaccinales, situation dans laquelle la sensibilité est considérée comme plus importante que la spécificité. Cette propriété devrait être prise en compte lorsque les tests ELISA sont utilisés pour le diagnostic. Dans les troupeaux de poulets commerciaux, il ne peut être exclu que l'utilisation d'un antigène ELISA de sérotype 1 permette aussi la détection d'anticorps induits par une infection naturelle par un IBV de sérotype 2, cependant cette éventuelle réactivité croisée n'a pas été signalée comme interférant avec les programmes de suivi sérologique de l'IBD en ELISA.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Deux types de vaccins sont pour l'essentiel disponibles pour maîtriser l'IBDV. Il s'agit des vaccins à virus vivants atténués, ou des vaccins à virus inactivé adjuvés avec un émulsifiant huileux (39). Un vaccin à virus vivant recombiné exprimant les antigènes de l'IBDV a également été autorisé (7).

Des recommandations pour la préparation des vaccins vétérinaires sont formulées au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les recommandations formulées ici ainsi qu'au Chapitre 1.1.8. ont une vocation générale et peuvent être complétées par des exigences nationales ou régionales.

À ce jour, les vaccins de l'IBD ont été préparés seulement avec des souches d'IBDV de sérotype 1, bien qu'un virus de sérotype 2 ait été détecté chez les volailles. Le virus de sérotype 2 n'a pas été décrit comme associé à une maladie, mais sa présence induira des anticorps. Les anticorps induits par le sérotype 2 ne confèrent aucune protection contre l'infection par les virus de sérotype 1 et n'interfèrent pas avec les réponses vaccinales aux virus de sérotype 1. Il y a eu de nombreuses descriptions de variants antigéniques des virus de sérotype 1 (31). Les études de protection croisée ont montré que des vaccins inactivés préparés à partir d'un virus « classique » de sérotype 1 doivent avoir un contenu antigénique important pour conférer une bonne protection vis-à-vis de certains de ces variants. Des vaccins de l'IBD contenant à la fois des souches classiques et des souches variantes du sérotype 1 sont maintenant autorisés. Des souches d'IBDV hypervirulentes (vvIBDV) porteuses de changements antigéniques limités par rapport aux virus classiques de sérotype 1 sont apparues depuis 1986. Une immunisation active à l'aide d'une souche virale ou vaccinale « classique » de sérotype 1 procure une protection efficace contre les vvIBDV (16), ceux-ci sont toutefois moins sensibles que les virus pathogènes « classiques » du sérotype 1 à la neutralisation par les anticorps d'origine maternelle (42).

• Modalités d'emploi des vaccins vivants

Les vaccins vivants de l'IBD sont produits à partir de souches virales totalement ou partiellement atténuées et qualifiées de « douces », « d'intermédiaires » ou « d'intermédiaires plus » (également dites « chaudes »).

Les vaccins « doux » ou « intermédiaires » sont utilisés chez les reproducteurs pour induire une réponse primaire avant qu'une vaccination de rappel soit réalisée juste avant l'entrée en ponte à l'aide d'un vaccin à virus inactivé. Les vaccins « doux » ou « intermédiaires » sont sensibles à la neutralisation par les anticorps d'origine maternelle et ne devraient par conséquent être administrés qu'une fois que ceux-ci ont disparu. Les vaccins sont administrés par injection intramusculaire, par nébulisation ou dans l'eau de boisson, en général à l'âge de 8 semaines (34).

Les vaccins « intermédiaires » ou « intermédiaires plus » sont utilisés pour les poulets de chair et les poulettes futures pondeuses d'œuf de consommation. Certains de ces vaccins sont également utilisés chez les jeunes futurs reproducteurs s'il y a un risque important d'infection spontanée par une souche pathogène d'IBDV. Bien que les vaccins intermédiaires soient sensibles à la présence d'anticorps d'origine maternelle, ils sont parfois administrés à l'âge de 1 jour, par nébulisation, pour protéger les sujets du troupeau qui pourraient être dépourvus d'anticorps d'origine maternelle ou n'en avoir que des quantités minimales. Cette approche permet aussi de constituer un réservoir de virus vaccinal au sein du lot, ce qui autorise ensuite une transmission horizontale aux autres sujets quand leur taux d'anticorps d'origine maternelle décroît. Une deuxième et troisième vaccination sont en général administrées, tout particulièrement lorsqu'il y a un risque important d'exposition aux formes virulentes de la maladie, ou lorsque les sujets vaccinés présentent des niveaux hétérogènes d'anticorps d'origine maternelle. La date d'application de ces vaccinations supplémentaires dépend du titre en anticorps des poules reproductrices lorsque les œufs ont été pondus. À titre d'exemple, la deuxième dose est en général administrée entre 10 et 14 jours d'âge, alors que 10 % du lot est sensible à l'IBD, et la troisième dose est administrée 7 à 10 jours plus tard. La voie d'administration est la nébulisation ou l'eau de boisson. L'injection intramusculaire ou

la goutte dans l'œil sont rarement utilisées. Lorsque le vaccin est administré dans l'eau de boisson, il importe d'utiliser de l'eau propre, de pH neutre, sans odeur ou résidus chlorés ou métalliques. De la poudre de lait écrémé peut être ajoutée à raison de 2 g par litre. Il faut veiller à ce que tous les oiseaux reçoivent leur dose de vaccin. Dans ce but, l'adduction d'eau doit être coupée 2 à 3 h avant la mise à disposition de la suspension vaccinale et il faut veiller à ce qu'il ne reste pas d'eau dans les canalisations de distribution ou les abreuvoirs. Il est possible de diviser le volume total de suspension vaccinale en deux moitiés, et de distribuer la seconde moitié du volume 30 min après la première.

Une technologie de développement récent consiste à administrer le vaccin dans les œufs pendant la période d'incubation. Le virus vaccinal vivant est mélangé à des anticorps anti-IBDV et le complexe antigène-anticorps est injecté *in ovo* au 18^e jour d'incubation. Les œufs sont ensuite amenés à éclosion et le vaccin se trouve libéré quand les poussins sont âgés d'environ 7 jours. De cette façon, le problème des anticorps d'origine maternelle se trouve contourné et les poussins sont immunisés efficacement (14).

Un vaccin à virus vivant recombiné qui utilise un virus comme vecteur (herpèsvirus de la dinde) pour exprimer la protéine VP2 de l'IBDV a été enregistré récemment en Europe pour les poulets. Il n'existe que peu d'informations disponibles concernant son utilisation.

Les vaccins vivants contre l'IBD sont dans l'ensemble considérés comme compatibles avec les autres vaccins aviaires. Il est toutefois possible que les vaccins contre l'IBD qui induisent des lésions de la bourse de Fabricius, puissent interférer avec la réponse aux autres vaccins. La vaccination doit être réservée aux animaux en bonne santé. Les ampoules de vaccin lyophilisé doivent être conservées à une température comprise entre 2 et 8 °C jusqu'au moment de l'utilisation.

- **Vaccins à virus inactivés : conditions d'emploi**

Les vaccins à virus inactivés contre l'IBD sont principalement utilisés pour induire des taux d'anticorps élevés, durables et homogènes chez les poules reproductrices qui ont été précédemment primo-immunisées durant la période d'élevage, soit par l'administration d'un vaccin vivant, soit par une exposition naturelle à un virus sauvage (6). Le programme habituel consiste à administrer le vaccin vivant à environ 8 semaines d'âge, puis le vaccin à virus inactivé entre 16 et 20 semaines. De façon plus occasionnelle, les vaccins à virus inactivés peuvent être inclus dans des programmes combinant l'utilisation de vaccins à virus vivants et à virus inactivés, chez des jeunes sujets de valeur, porteurs de quantités importantes d'anticorps d'origine maternelle et élevés dans des zones où le risque d'exposition à des IBDV virulents est important. Les vaccins inactivés sont produits sous la forme d'émulsions « eau-dans-l'huile » et doivent être injectés individuellement à chaque oiseau. Les voies d'administration à privilégier sont la voie intramusculaire dans les muscles de la patte, en évitant la proximité des articulations, des tendons et des principaux vaisseaux sanguins, ou la voie sous-cutanée. Une seringue automatique multidoses peut être utilisée. La totalité de l'équipement doit être nettoyée et stérilisée entre chaque lot, et les équipes de vaccination doivent mettre en œuvre des règles d'hygiène strictes lorsqu'elles passent d'un lot à un autre. Le vaccin doit être stocké à une température comprise entre 4 et 8 °C. Il ne doit pas être congelé, ni exposé à une lumière intense ou à des températures élevées.

Seuls les oiseaux en bonne santé, dont on sait qu'ils ont été sensibilisés par une exposition préalable à l'IBDV, devraient être vaccinés. Utilisé de cette façon, le vaccin devrait induire une réponse immunitaire suffisamment bonne pour que les poussins issus de tels parents héritent d'une protection passive suffisante pour les protéger contre l'IBD jusqu'à l'âge d'environ 30 jours (45). Cette durée couvre la période de plus grande sensibilité à la maladie et prémunit contre les lésions de la bourse à un âge où elles pourraient provoquer une immunodépression. Il a été démontré que les lésions bursales survenant après l'âge de 15 jours ont peu d'effet sur l'immunocompétence car à cet âge les cellules immunocompétentes ont migré vers les tissus lymphoïdes périphériques. Cependant, s'il y a un risque d'infection par les souches très virulentes de l'IBDV, il convient d'appliquer des vaccins vivants de l'IBD selon les principes décrits ci-dessus. Le niveau précis et la durée de l'immunité conférée par les vaccins à virus inactivés dépendront principalement de la concentration antigénique présente dans chaque dose. L'objectif de production devrait être d'obtenir une concentration antigénique élevée et donc un vaccin hautement immunogène.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

- **Vaccin à virus vivant**

Il faut démontrer que la semence virale est exempte d'agents étrangers tels que virus, bactéries, mycoplasmes et moisissures, et tout particulièrement d'agents pathogènes pour les oiseaux. Ceci inclut l'absence de contamination par d'autres souches d'IBDV que la souche vaccinale. Pour les souches vaccinales censées être atténuées et non immunodépressives, le virus du lot de semence doit s'avérer

stable, sans tendance à la réversion vers la virulence. Cette stabilité peut être démontrée en réalisant au moins 5 passages consécutifs de poulet à poulet, à 3 ou 4 jours d'intervalle, en utilisant une suspension bursale comme inoculum, chez des poulets exempts d'organismes pathogènes spécifiés de l'âge minimum requis pour la vaccination. On doit démontrer que le virus a effectivement été transmis. Une étude histologique comparative est ensuite réalisée pour montrer qu'il n'y a pas de différence entre les bourses des sujets inoculés avec le matériel initial et celle des sujets ayant reçu le matériel inoculé au dernier passage. Des scores lésionnels (29) et des techniques d'imagerie ont été développés.

Mesure du pouvoir immunodépresseur : une caractéristique importante du virus est qu'il ne devrait pas causer de lésions bursales qui pourraient provoquer une immunodépression chez des sujets sensibles. Des vaccins vivants de type « intermédiaire » ou « intermédiaire plus » peuvent être autorisés bien qu'ils puissent s'avérer capables d'induire une immunodépression. Un protocole éventuel pour l'évaluation expérimentale de l'effet immunodépresseur est le suivant : le vaccin de la bursite infectieuse est administré par injection ou par goutte dans l'œil, une dose recommandée par sujet, à 20 poulets EAPS âgés d'un jour. Un autre groupe de poulets de même âge et de même origine est hébergé séparément à titre de témoin. À l'âge de 2 semaines, chaque sujet dans chaque groupe reçoit une dose (telle que définie par le fabricant) d'un vaccin vivant de la maladie de Newcastle, administré par goutte dans l'œil. Un autre protocole possible consiste à administrer le vaccin de la bursite infectieuse à l'âge minimum recommandé par le fabricant, puis le vaccin de la maladie de Newcastle à l'âge auquel les lésions de la bourse de Fabricius induites par le vaccin de la bursite infectieuse sont maximales. Le titre en anticorps inhibant l'hémagglutination (IHA) est mesuré en réponse au vaccin de la maladie de Newcastle chez chaque sujet, 2 semaines après l'administration de ce vaccin, et la protection conférée est mesurée après une épreuve virulente réalisée avec une dose comprise entre $10^{5,0}$ et $10^{6,5}$ DLE₅₀ (doses létales médianes pour l'embryon) de la souche Herts 33/56 (ou d'une souche virale équivalente) du virus de la maladie de Newcastle. Le vaccin de la bursite infectieuse ne satisfait pas aux exigences du test si la réponse IHA et la protection induites par le vaccin de la maladie de Newcastle sont significativement inférieures ($p < 0,01$) dans le groupe qui a reçu le vaccin de la bursite infectieuse, comparé au groupe témoin. Dans les pays exempts de maladie de Newcastle, un autre protocole possible est d'utiliser des globules rouges de mouton, ou une suspension inactivée de *Brucella abortus* comme antigène, en mesurant ensuite les réponses en anticorps respectivement à l'aide de l'épreuve d'hémagglutination ou de l'épreuve de séro-agglutination. Toutefois, l'utilisation d'un autre vaccin vivant constitue un système révélateur préférable dans la mesure où il permet aussi d'évaluer l'immunité à médiation cellulaire.

- **Vaccins à virus inactivés**

Pour les vaccins à virus inactivés, les caractéristiques les plus importantes sont un contenu antigénique important et un bon pouvoir immunogène. Des souches virales pathogènes ou atténuées ont été utilisées. Il doit être démontré que le lot de semence virale est exempt de virus, bactéries, mycoplasmes et moisissures et tout particulièrement exempt d'agents pathogènes pour les oiseaux (38).

b) Méthode de culture

Le virus de semence peut être propagé en utilisant différents systèmes culturels, tels que les cultures de fibroblastes d'embryon de poulet EAPS, ou les œufs de poule embryonnés. Dans certains cas, la propagation sur poulet (récolte des bourses de Fabricius) peut être utilisée. Le stock est distribué en parties aliquotes qui sont lyophilisées en ampoules scellées. Il a été prétendu que les vaccins fabriqués à partir de tissu de bourses sont de meilleurs immunogènes que les vaccins de culture. En fait, il a été démontré par des études en conditions contrôlées que les deux types de vaccin induisent la même réponse immunitaire pour autant qu'ils contiennent la même quantité d'antigènes.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Des données sur l'efficacité devraient être obtenues avant que la production à large échelle du vaccin ne soit entreprise. Le vaccin devrait être administré aux oiseaux en utilisant la méthode d'administration qui sera utilisée sur le terrain. Les vaccins à virus vivants peuvent être administrés à de jeunes oiseaux et la réponse de ces derniers mesurée par une épreuve sérologique ou par résistance à une épreuve expérimentale. Dans le cas des vaccins à virus inactivés, une épreuve doit être réalisée chez des oiseaux plus âgés qui vont entrer en ponte, en suivant le protocole de vaccination recommandé par le fabricant, de façon à ce que la descendance des sujets vaccinés puisse être testée dans le but d'évaluer la protection conférée par les anticorps d'origine maternelle au début et à la fin de la période de ponte.

- **Vaccin à virus vivant**

Test d'efficacité : administrer une dose de vaccin contenant le titre viral minimum recommandé à chaque poulet EAPS d'un groupe de 20 sujets ayant l'âge minimum recommandé pour la vaccination. Inoculer un groupe séparé pour chacune des voies d'administration recommandées. Conserver 20 sujets issus de la

même éclosion pour constituer un lot témoin non inoculé. Après 14 jours, éprouver chacun des poulets par instillation intra-oculaire avec environ 100 DIP₅₀ (Dose de virus infectant 50 % des poulets) d'une souche d'IBDV pathogène choisie selon les recommandations de l'un des Laboratoires de référence de l'OIE pour l'IBD (se reporter à la liste de la Partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Observer les poulets quotidiennement pendant 10 jours. Enregistrer le nombre de poulets qui meurent ou présentent des signes cliniques d'IBD. Réaliser un examen histologique de la bourse de Fabricius chez les sujets survivant au 10^e jour après inoculation. Le vaccin satisfait aux exigences du test si au moins 90 % des poulets vaccinés survivent sans présenter de symptômes ou de lésions sévères de la bourse de Fabricius à l'issue de la période d'observation. L'essai n'est pas validé si plus de la moitié des témoins éprouvés ne présentent pas de symptômes d'IBD, ou si un (ou plusieurs) des poulets témoins ne présente(nt) pas de lésions sévères de la bourse de Fabricius, ou si les sujets témoins ou inoculés meurent pour des raisons non attribuables au test. Les lésions de la bourse de Fabricius sont considérées comme sévères si au moins 90 % des follicules présentent au moins 75 % de déplétion lymphocytaire. Sous réserve que ses résultats soient satisfaisants, ce test peut n'être réalisé que sur un seul des lots dérivés d'un même lot de semence.

- **Vaccins à virus inactivés**

Test d'efficacité : un premier protocole est d'utiliser au moins 20 oiseaux EAPS non primo-immunisés qui reçoivent chacun une dose, de vaccin à un âge de vaccination (proche de l'entrée en ponte) et selon une voie d'administration recommandée ; un protocole alternatif est de tester une dose de vaccin par voie d'administration recommandée en utilisant 20 oiseaux EAPS non primo-immunisés. La réponse en anticorps est mesurée entre 4 et 6 semaines après la vaccination, par SN, par comparaison à un sérum de référence³.

Les œufs sont collectés en vue de l'éclosion 5 à 7 semaines après la vaccination, et 25 des poussins qui en sont issus sont éprouvés à l'âge de 3 semaines par instillation intra-oculaire avec environ 100 DIP₅₀ d'une souche pathogène reconnue du virus de la bursite infectieuse. 10 poulets témoins de même souche génétique mais issus de parents non vaccinés sont aussi éprouvés. La protection est évaluée 3 à 4 jours après l'épreuve, en prélevant la bourse de Fabricius de chaque oiseau, chaque bourse étant ensuite soumise à un examen histologique ou à une recherche des antigènes viraux par l'épreuve d'IDG. Pas plus de trois sujets issus des parents vaccinés devraient présenter des résultats témoignant d'une infection par l'IBDV, alors que tous les poulets issus des parents non vaccinés devraient être infectés.

Ce protocole devrait être répété à l'approche de la fin de la période de ponte quand les reproductrices vaccinées ont au moins 60 semaines, mais dans ce cas les poussins issus devraient être éprouvés à l'âge de 15 jours.

Le test d'efficacité devrait être répété sur des sujets primo-immunisés ensuite vaccinés selon le programme recommandé. La dose de vaccin à virus inactivé finalement utilisée doit être administrée à l'âge minimum recommandé pour la vaccination. Les poulets éclos des œufs collectés en début et en fin de période de ponte sont testés, pour ce qui concerne la protection, selon le protocole décrit ci-dessus.

Ces tests peuvent n'être réalisés qu'une seule fois en utilisant un lot de vaccin représentatif.

2. Méthodes de fabrication

Le vaccin doit être produit dans des locaux adaptés propres et sécurisés, bien séparés des zones où sont réalisées les activités de diagnostic ou des zones d'élevage commercial des volailles.

La production du vaccin devrait être basée sur un système « semence-lot » en utilisant une souche virale adaptée d'origine et d'historique de propagation connus. Des œufs EAPS doivent être utilisés pour tous les réactifs employés lors de la propagation ou du testage du vaccin. Les vaccins à virus vivants sont produits par culture sur œuf ou culture cellulaire. Les vaccins à virus inactivés sont produits soit à partir de virus pathogènes cultivés sur la bourse de Fabricius de jeunes oiseaux, soit à partir de virus atténués adaptés à la propagation au laboratoire et multipliés sur culture cellulaire ou sur œuf embryonné. Un titre viral élevé est nécessaire. Ces vaccins sont formulés sous la forme d'émulsions « eau dans l'huile ». Un exemple typique de formulation consiste à mélanger 80 % d'huile minérale à 20 % d'une suspension aqueuse d'homogénat bursal, en présence d'agents émulsifiants adaptés.

3. Contrôles en cours de fabrication

Contenu antigénique : une fois le virus cultivé jusqu'à un titre viral élevé, celui-ci devrait être évalué sur cultures cellulaires, œuf embryonné ou sur poulets, selon ce qui est le plus adapté à la souche virale utilisée. La

3 Voir la note de bas de page n°2

détermination du contenu antigénique requis pour produire des lots de vaccins satisfaisants repose sur l'étude de vaccins expérimentaux dont on a démontré l'efficacité dans des essais de laboratoire et de terrain.

Inactivation des vaccins à virus inactivés : elle est souvent réalisée soit avec la β -propiolactone soit avec le formol. On doit avoir démontré que dans les conditions de production du vaccin, l'agent inactivant et la procédure d'inactivation inactivent efficacement le virus vaccinal et tout agent contaminant, par exemple bactérien, qui pourrait être présent dans les réactifs de départ.

Avant inactivation, il convient de s'assurer que la suspension virale est homogène et exempte de particules à l'intérieur desquelles l'agent inactivant pourrait ne pas accéder. L'inactivation du vaccin doit être vérifiée par un test pratiqué sur chaque lot dérivé de la récolte à grande échelle ainsi que sur le produit final. Une autre approche consiste à vérifier l'inactivation soit sur l'un ou sur l'autre mais pas sur les deux. Le test choisi doit être adapté à la souche vaccinale qui est utilisée et devrait consister en au moins deux passages sériés sur cultures cellulaires, œufs embryonnés ou poulets sensibles, avec dix répétitions par passage. Aucune présence d'un quelconque virus ou microorganisme vivant ne devrait être détectée.

Stérilité des vaccins à virus inactivés : l'huile minérale incorporée dans le vaccin doit être stérilisée par chauffage à 160 °C pendant 1 h, ou par filtration, et l'efficacité du protocole de stérilisation doit avoir été démontrée. Les tests adaptés à l'étude des vaccins à virus inactivés doivent être pratiqués sur chaque lot du produit fini, ainsi que décrit par exemple dans la Pharmacopée Européenne.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests destinés à démontrer la stérilité et l'absence de contamination par des éléments biologiques sont décrits au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

- **Innocuité des vaccins à virus vivants**

Dix doses recommandées du vaccin sont administrées par instillation intra-oculaire à chacun des sujets d'un groupe de 15 poulets EAPS de l'âge minimum recommandé pour la vaccination et d'un âge maximum de 2 semaines. Les poulets sont observés pendant 21 jours. Si plus de deux poulets meurent de causes non liées au vaccin, le test doit être répété. Le vaccin ne satisfait pas aux exigences du test si un (ou plusieurs) poulet(s) meurt(ent) ou présente(nt) des symptômes attribuables au vaccin. Le test est répété sur chaque lot du vaccin arrivé au stade « produit fini ».

- **Innocuité des vaccins à virus inactivé**

Dix poulets EAPS, âgés de 14 à 28 jours, sont inoculés par les voies d'administration recommandées avec la dose recommandée ou une dose double de celle-ci. Les oiseaux sont observés pendant 3 semaines. Aucune réaction anormale, locale ou systémique, ne devrait se développer. Le test est répété sur chaque lot du vaccin arrivé au stade « produit fini ».

c) Activité

- **Test d'activité des vaccins à virus vivant**

Un test d'activité (titrage viral) doit être réalisé sur œufs embryonnés ou cultures cellulaires pour chaque lot de vaccin produit. De surcroît, la méthode décrite au paragraphe C.1.c « Vaccin à virus vivant (test d'efficacité) » doit être pratiquée sur un lot représentatif de l'ensemble de tous les lots produits à partir du même lot de semence.

- **Test d'activité des vaccins à virus inactivé**

Dix poulets EAPS, âgés d'environ 4 semaines, sont chacun vaccinés avec une dose de vaccin administrée par la voie recommandée. Dix autres poulets témoins de la même origine et du même âge sont hébergés avec les sujets vaccinés. La réponse sérologique de chaque poulet est déterminée 4 à 6 semaines après vaccination, à l'aide d'un test de SN en faisant référence à un antisérum de référence inclus à titre de témoin. Le niveau moyen des anticorps chez les sujets vaccinés ne devrait pas être significativement inférieur à celui mesuré lors du test de protection. Aucun anticorps ne devrait être détecté chez les sujets témoins non vaccinés. Ce test doit être répété sur chaque lot du vaccin arrivé au stade « produit fini ».

d) Stabilité

Il conviendrait de démontrer sur trois lots du vaccin que celui ci satisfait encore le test d'activité de lot lorsque le vaccin a été stocké pendant une durée excédant de 3 mois sa date de péremption.

e) Agents de conservation

Un agent de conservation est en général nécessaire pour les vaccins présentés en flacons multidoses. La concentration de l'agent de conservation dans le vaccin arrivé au stade « produit fini » et sa persistance au cours du stockage et jusqu'à péremption devraient être vérifiées. Un agent de conservation adapté, ayant déjà fait ses preuves pour une telle utilisation, devrait être utilisé.

f) Précautions d'emploi et mise en garde

Les vaccins en émulsion huileuse provoquent, s'ils sont accidentellement injectés dans la main ou dans d'autres tissus, des blessures graves chez le personnel réalisant la vaccination. Dans le cas d'un tel accident, la personne blessée devrait être conduite immédiatement à l'hôpital et emporter avec elle l'emballage du vaccin. L'étiquette de chaque bouteille de vaccin et chaque emballage devraient comporter une mention claire avertissant l'utilisateur des conséquences graves des blessures qu'il est susceptible de s'infliger. De telles blessures devraient être traitées par le service médical d'urgence comme celles infligées dans l'industrie par les pistolets graisseurs.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir paragraphe C.4.b.

b) Activité

Voir paragraphe C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS (1998). Chapter 43. *In: Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fourth Edition.* AAAP, University of Pennsylvania, New Bolton Center, Kenneth Square, PA 19348-1692, USA.
2. AZAD A.A, JAGADISH M.N., BROWN M.A. & HUDSON P.J. (1987). Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology*, **161**, 145–152.
3. BROWN M.D., GREEN P. & SKINNER M.A. (1994). VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of classical strains. *J. Gen. Virol.*, **75**, 675–680.
4. BOOT H.J., TER HUURNE A.A., HOEKMAN A.J., PEETERS B.P., & GIELKENS A.L. (2000). Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *J. Virol.*, **74**, 6701–6711.
5. CULLEN G.A. & WYETH P.J. (1975). Quantitation of antibodies to infectious bursal disease. *Vet. Rec.*, **97**, 315.
6. CULLEN G.A. & WYETH P.J. (1976). Response of growing chickens to an inactivated IBD antigen in oil emulsion. *Vet Rec.*, **99**, 418.
7. DARTEIL R., BUBLOT M., LAPLACE E., BOUQUET J.F., AUDONNET J.C. & RIVIÈRE M. (1995). Herpes virus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induces protection against an IBDV virulent challenge in chickens. *Virology*, **211**, 4781–4790.
8. DAVIS V. & BOYLE J.A. (1990). Random cDNA probes to infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, **34**, 329–335.
9. ETERRADOSSI N., ARNAULD C., TEKAIA F., TOQUIN D., LE COQ H., RIVALLAN G., GUITTET M., DOMENECH J., VAN DEN BERG T.P. & SKINNER M.A. (1999). Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate. *Avian Pathol.*, **28**, 36–46.
10. ETERRADOSSI N., ARNAULD C., TOQUIN D. & RIVALLAN G. (1998). Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch. Virol.*, **143**, 1627–1636.

11. ETERRADOSSI N., PICAULT J.P., DROUIN P., GUITTET M., L'HOSPITALIER R. & BENNEJEAN G. (1992). Pathogenicity and preliminary antigenic characterization of six infectious bursal disease virus strains isolated in France from acute outbreaks. *J. Vet. Med. [B]*, **39**, 683–691.
12. ETERRADOSSI N., RIVALLAN G., TOQUIN D. & GUITTET M. (1997). Limited antigenic variation among recent infectious bursal disease virus isolates from France. *Arch. Virol.*, **142**, 2079–2087.
13. FAHEY K.J., MCWATERS P., BROWN M.A., ERNY K., MURPHY V.J. & HEWISH D.R. (1991). Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. *Avian Dis.*, **35**, 365–373.
14. HADDAD E.E., WHITFILL C.E., AVAKIAN A.P., RICKS C.A., ANDREWS P.D., THOMA J.A. & WAKENELL P.S. (1997). Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis.*, **41**, 882–889.
15. JACKWOOD D.H. & SAIF Y.M. (1987). Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.*, **31**, 766–770.
16. JACKWOOD D.J. (1990). Development and characterization of nucleic acid probes to infectious bursal disease viruses. *Vet. Microbiol.*, **24**, 253–260.
17. JACKWOOD D.J. & JACKWOOD R.J. (1997). Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. *Avian Dis.*, **41**, 97–104.
18. KOUWENHOVEN B. & VAN DER BOS J. (1993). Control of very virulent infectious bursal disease (Gumboro disease) in the Netherlands with so called 'hot' vaccines. Proceedings of the 42nd Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California, USA, 37–39.
19. KWANG M.J., LU Y.S., LEE L.H., LIN D.F., LIAO Y.K. LEE C. & LEE Y.L. (1987). Detection of infectious bursal disease viral antigen prepared from the cloacal bursa by ELISA. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.*, **13**, 265–269.
20. LASHER H.N. & SHANE S.M. (1994). Infectious bursal disease. *World's Poult. Sci.*, **50**, 133–166.
21. LE NOUEN C., RIVALLAN G., TOQUIN D., DARLU P., MORIN Y., BEVEN V., DE BOISSESON C., CAZABAN C., GARDIN Y. & ETERRADOSSI N. (2006). Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment B-reassorted isolate. *J. Gen. Virol.*, **87**, 209–216.
22. LE NOUEN C., RIVALLAN G., TOQUIN D. & ETERRADOSSI N. (2005). Significance of the genetic relationships deduced from partial nucleotide sequencing of infectious bursal disease virus genome segments A or B. *Arch. Virol.*, **150**, 313–325.
23. LIM B.L., CAO Y., YU T. & MO C.W. (1999). Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284. *J. Virol.*, **73**, 2854–2862.
24. LIN Z., KATO A., OTAKI Y., NAKAMURA T., SASMAZ E. & UEDA S. (1993). Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis.*, **37**, 315–323.
25. LUKERT P.D. & SAIF Y.M. (1997). Infectious bursal disease. In: Diseases of Poultry, Tenth Edition, Calnek B.W., ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 721–738.
26. MARQUARDT W.W., JOHNSON R.B., ODENWALD W.F. & SCHLOTTHOKEN B.A. (1980). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, **24**, 375–385.
27. MEULEMANS G., ANTOINE O. & HALEN P. (1977). Application de l'immunofluorescence au diagnostic de la Maladie de Gumboro. *OIE Bull.*, **88**, 225–229.
28. MUNDT E. (1999). Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J. Gen. Virol.*, **80**, 2067–2076.
29. MUSKETT J.C., HOPKINS I.G., EDWARDS K.R. & THORNTON D.H. (1979). Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: Efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Vet. Rec.*, **104**, 332–334.
30. REED L.J. & MUENCH H. (1938). A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.*, **27**, 493–497.
31. ROSENBERGER J.K. & CLOUD S.S. (1986). Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **189**, 357.

32. ROSENBERGER J.K., KLOPP S., ECKROADE R.J. & KRAUSS W.C. (1975). The role of the infectious bursal agent and several adenoviruses in the hemorrhagic-aplastic anaemia syndrome and gangrenous dermatitis. *Avian Dis.*, **19**, 717–729.
33. SCHNITZLER D., BERNSTEIN F., MÜLLER H. & BECHT H. (1993). The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, **74**, 1563–1571.
34. SKEELES J.K., LUKERT P.D., FLETCHER O.J. & LEONARD J.D. (1979). Immunisation studies with a cell-culture adapted infectious bursal virus. *Avian Dis.*, **23**, 456–465.
35. SMILEY J.R., SOMMER S.E. & JACKWOOD D.J. (1999). Development of a ssRNA internal control reagent for an infectious bursal disease virus reverse transcription / polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism diagnostic assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 497–504.
36. SNYDER D.B., LANA D.P., SAVAGE P.K., YANCEY F.S., MENGEL S.A. & MARQUARDT W.W. (1988). Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: Evidence for a major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis.*, **32**, 535–539.
37. SNYDER D.B., VAKHARIA V.N. & SAVAGE P.K. (1992). Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Arch. Virol.*, **127**, 89–101.
38. THORNTON D.H. & MUSKETT J.C. (1982). Quality control methods for inactivated infectious bursal disease vaccines. *Dev. Biol. Stand.*, **51**, 235–241.
39. THORNTON D.H. & PATTISON M. (1975). Comparison of vaccines against infectious bursal disease. *J. Comp. Pathol.*, **85**, 597–610.
40. VAKHARIA V.N., HE J., AHAMED B. & SNYDER D.B. (1994). Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res.*, **31**, 265–273.
41. VAN DEN BERG T.P., GONZE M., MORALES D. & MEULEMANS G. (1996). Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. *Avian Pathol.*, **25**, 751–768.
42. VAN DEN BERG T.P. & MEULEMANS G. (1991). Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian Pathol.*, **20**, 409–421.
43. WU C.C., LIN T.L., ZHANG H.G., DAVIS V.S. & BOYLE J.A. (1992). Molecular detection of infectious bursal disease virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **36**, 221–226.
44. WU C.C., RUBINELLI P. & LIN T.L. (2007). Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, **51**, 515–526.
45. WYETH P.J. & CULLEN G.A. (1979). The use of an inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccine in commercial broiler parent chickens. *Vet. Rec.*, **104**, 188–193.
46. ZIERENBERG K., RAUE R., & MULLER H. (2001). Rapid identification of very virulent strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. *Avian Pathol.*, **30**, 55–62.

RÉFÉRENCES RÉCENTES

- A. ETERRADOSSI N. (2001). Major advances in infectious bursal disease virus (IBDV) research since the first International IBDV/CIHV Symposium (Rauischolzhausen, Germany, 1994). Proceedings of the 2nd International Symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia, Kaleta E. & Heffels-Redmann U., eds. Rauischolzhausen, Germany, 16–20 June 2001, 6–23.
- B. VAN DEN BERG T.P. (2000). Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol.*, **29**, 175–194.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la bursite infectieuse aviaire (ou maladie de Gumboro) (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

MALADIE DE MAREK

RÉSUMÉ

La maladie de Marek (MD pour Marek's Disease) est une maladie causée par un alphaherpèsvirus. Elle est caractérisée par une affection lymphomateuse et neuropathique chez les volailles domestiques.

Le diagnostic est réalisé sur la base des signes cliniques et des lésions macroscopiques et microscopiques. Néanmoins, les poulets peuvent développer une infection latente par le virus de la MD (MDV) sans avoir montré de signes cliniques. L'infection par le MDV est révélée par l'isolement viral et/ou la mise en évidence d'antigènes viraux ou d'anticorps.

La prophylaxie contre la MD recourt à la vaccination au moyen de vaccins mono- ou multivalents de différents types. Les vaccins peuvent être administrés in ovo ou chez le poussin d'un jour.

Chez le poulet, la MD peut apparaître dès l'âge de 3 ou 4 semaines, mais elle est plus couramment rencontrée entre 12 et 30 semaines. Les symptômes observés sont de la paralysie des pattes et des ailes, associée à un épaississement des nerfs périphériques. Cependant, l'atteinte des nerfs passe parfois inaperçue, particulièrement chez les adultes. En fonction de la souche de MDV infectante, une lymphomatose peut se produire principalement au niveau de l'ovaire, du foie, de la rate, des reins, du cœur, du proventricule succenturié et de la peau. Alors qu'une uniformité cellulaire est rencontrée dans les tumeurs associées au virus de la leucose aviaire, plusieurs types de cellules lymphoïdes constituent les infiltrations nerveuses et les lymphomes associés au MDV. Des tumeurs ressemblant à celles provoquées par le MDV sont dues au rétrovirus aviaire, le virus réticulo-endothélial (REV). Le diagnostic différentiel principal de la MD est la leucose lymphoïde. Des lésions associées au virus de la réticulo-endothéliose peuvent également être confondus avec ceux de la MD.

Identification de l'agent pathogène : *dans les conditions de terrains, la plupart des poulets s'infectent au cours des premières semaines de vie et deviennent porteurs latents de l'infection à vie, souvent sans développer de signes cliniques. L'infection est habituellement diagnostiquée par l'inoculation de cellules blanches du sang (buffy coat) sur des cultures de cellules rénales de poulet ou sur des fibroblastes embryonnaires de canard, sur lesquelles un effet cytopathogène (ECP) apparaît en quelques jours. Le MDV est divisé en deux sérotypes principaux : MDV-1 et MDV-2, auxquels peut être ajouté un troisième représenté par l'herpèsvirus du dindon apparenté au MDV (HVT pour Herpesvirus of Turkeys). Le sérotype 1 comprend des souches virulentes et le sérotype 2 des souches naturellement avirulentes. Les antigènes viraux peuvent être détectés dans les hampes plumifères des oiseaux infectés par un test à la précipitine rayonnante.*

Épreuves sérologiques : *les anticorps spécifiques du MDV apparaissent 1 à 2 semaines après l'infection. Ils peuvent être détectés par différentes méthodes : une épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) ; une épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) ; ou une épreuve immuno-enzymatique (ELISA).*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *la MD peut être prévenue par la vaccination des poulets in ovo ou chez le poussin d'un jour. Les vaccins utilisés sont du type à virus vivants atténués. Les souches virales les plus utilisées appartiennent au HVT. Les formulations vaccinales contiennent soit du virus libre (lyophilisé), soit du virus associé aux cellules (forme humide). Des souches atténuées issues du sérotype 1 du MDV sont les plus couramment utilisées ; des souches du sérotype 2 peuvent aussi être utilisées notamment pour les vaccins combinés, bivalents, qui associent le HTV (sérotype 3). Les formulations vaccinales contenant les sérotypes 1 et 2 ne sont disponibles que sous forme*

associée aux cellules. Il existe également des vaccins trivalents, associant les sérotypes 1, 2 et 3. Les vaccins bivalents (sérotypes 1 et 3) ou les vaccins trivalents (sérotypes 1, 2 et 3) sont aussi utilisés. Les vaccins bi- et trivalents ont été mis sur le marché pour lutter contre les souches hypervirulentes de MDV pour lesquelles la vaccination monovalente était relativement inefficace.

La vaccination réduit fortement la sévérité des signes cliniques associés au MDV, mais n'empêche pas l'infection persistante. Les virus vaccinaux s'installent par ailleurs à l'état latent chez les volailles vaccinées et sont excrétés, ce qui se traduit par la présence permanente du MDV.

A. INTRODUCTION

La maladie de Marek (MD) est une maladie de la volaille domestique (poulet) causée par un herpesvirus (14, 25, 33). Les oiseaux s'infectent par inhalation de poussières infectées dans les poulaillers et, après un cycle viral complexe, le virus est excrété au niveau des follicules plumoux des oiseaux infectés (4). La MD peut se produire dès l'âge de 3 à 4 semaines, mais apparaît le plus souvent vers 12 à 30 semaines. La MD est associée à plusieurs syndromes différents, parmi lesquels les syndromes lymphoprolifératifs sont les plus fréquents. Dans la forme classique, la MD se caractérise par une atteinte principalement nerveuse. La mortalité n'excède que rarement 10 à 15 % et survient au bout de quelques semaines à quelques mois. Dans la forme aiguë, la maladie aboutit à la formation de lymphomes viscéraux. L'incidence au sein d'un groupe de volailles est alors de 10 à 30 %. Des épisodes impliquant jusqu'à 70 % des animaux peuvent survenir. La mortalité peut se maintenir de façon enzootique pendant des mois. La forme la plus prévalente actuellement est l'atteinte aiguë avec des lymphomes viscéraux étendus. Le signe clinique le plus fréquent de la forme chronique est la paralysie partielle ou complète des pattes et des ailes. Dans la forme aiguë, les oiseaux sont souvent apathiques et il n'est pas rare d'observer une mortalité sans aucun signe précurseur. Une maladie sans tumeur mais avec un œdème du cerveau entraînant une paralysie temporaire est de plus en plus associée à une MD due aux souches les plus virulentes.

Dans la forme classique, la lésion caractéristique est l'épaississement d'un ou de plusieurs nerfs. Les plus fréquemment atteints, et les plus aisément repérés à l'autopsie, sont les plexus brachiaux et sciatiques, le plexus coélique, le nerf vague abdominal et les nerfs intercostaux. Les nerfs atteints ont une épaisseur 2 à 3 fois supérieure à la normale ; leur apparence normale striée disparaît et leur couleur vire au gris ou au jaune ; ils sont parfois œdématisés. Des lymphomes peuvent apparaître dans la forme classique de la MD. Ils prennent le plus souvent l'aspect de petites tumeurs ovariennes molles et grises (parfois aussi dans les poumons, les reins, le cœur, le foie ou d'autres tissus). L'œil gris, fréquemment observé chez les oiseaux âgés (16 à 18 semaines) causé par une iridocyclite, est parfois le seul signe de la forme classique. Cette affection entrave le réflexe d'accommodation de l'iris en face d'un stimulus lumineux. Cela peut également entraîner une torsion de la pupille.

Dans la forme aiguë, la lésion classique consiste en un lymphome disséminé, diffus atteignant le foie, les gonades, la rate, les reins, les poumons, le proventricule et le cœur. Des lymphomes peuvent atteindre soit la peau autour des follicules plumoux, soit les muscles squelettiques. Les oiseaux atteints présentent généralement des nerfs périphériques épais tels que rencontrés dans la forme classique. Chez les jeunes volailles, l'hépatomégalie est souvent modérée, alors que les adultes auront une hépatomégalie manifeste dont l'apparence macroscopique est identique à celle rencontrée dans la leucose lymphoïde. Les lésions nerveuses sont souvent absentes chez les adultes.

Dans les formes classique et aiguë de la MD, la maladie débute par une prolifération de cellules lymphoïdes qui progresse dans certains cas et régresse dans d'autres. Les nerfs périphériques peuvent présenter trois types d'atteintes, soit proliférative, soit inflammatoire, soit légèrement infiltrante. Les lésions sont dénommées respectivement de types A, B et C. Les lésions du type A consistent en une infiltration par des lymphoblastes prolifératifs, des lymphocytes grands, moyens et petits et des macrophages. Ces lésions A ont un aspect néoplasique manifeste. Les lésions de type B sont caractérisées par un œdème interneural, une infiltration principalement de petits lymphocytes et de cellules sanguines, et une prolifération des cellules de Schwann. Leur aspect est inflammatoire. Les lésions de type C consistent en une légère infiltration par des petits lymphocytes. Ces lésions sont observées sur les oiseaux sans lésions macroscopiques ni signes cliniques ; elles pourraient être une lésion inflammatoire régressive. La démyélinisation se produit fréquemment dans les nerfs atteints par les lésions A et B et est responsable de la paralysie clinique.

Les lymphomes qui se développent au niveau des viscères et des autres tissus ont une cytologie similaire aux lésions lympho-prolifératives et de type A nerveuses. Les cellules lymphoïdes sont souvent de plusieurs types à prédominance de lymphocytes moyens et petits. Il arrive que des grands lymphocytes et des lymphoblastes soient prédominants dans des formes aiguës des MD chez les adultes.

La population hétérogène des cellules lymphoïdes rencontrées dans les lymphomes de la MD révélée sur des coupes colorées à l'hématoxyline-éosine ou des frottis colorés par le May-Grünwald Giemsa est un élément

fondamental pour distinguer la maladie de la leucose lymphoïde dans laquelle l'infiltration lymphomateuse est composée de lymphoblastes uniformes. Par ailleurs, une autre différence se marque au niveau de la bourse de Fabricius. En effet, dans la leucose lymphoïde, des tumeurs macroscopiques s'y développent et ces tumeurs ont une origine intrafolliculaire et sont très proliférantes. Dans la MD, bien que la bourse soit parfois le siège d'infiltrations lymphoproliférantes, la tumeur est peu apparente, diffuse et se situe entre les follicules. Enfin, les lésions nerveuses périphériques très communes dans la MD ne se manifestent pas dans la leucose lymphoïde. Les formes les plus difficiles à différencier dans la MD de la leucose proviennent de cas d'oiseaux adultes présentant des tumeurs lymphoblastiques avec une hépatomégalie marquée et sans atteinte nerveuse. Si des autopsies sont réalisées, un diagnostic peut généralement être porté sur la base des lésions macroscopiques et histopathologiques. Cependant, d'autres techniques sont décrites. L'expression d'un marqueur biochimique Meq a été utilisée pour différencier entre les formes tumorales de la MD, les infections latentes de MD et les tumeurs produites par des rétrovirus (3). Les protocoles exigent du matériel et des réactifs spécifiques, et les laboratoires qui en sont dépourvus peuvent ne pas pouvoir réaliser ces techniques. D'autres techniques comme la détection par immunofluorescence des antigènes des lymphocytes T activés présents à la surface des cellules tumorales de la MD (MATSA pour *MD tumour-associated surface antigen*) ou des antigènes des cellules B ou d'IgM présentes à la surface des cellules tumorales, permettent une suspicion mais elles ne sont pas spécifiques des cellules tumorales de la MD.

Certaines souches du virus de la réticuloendothéliose (RE) induisent des lésions nerveuses et des proliférations lymphomateuses similaires à ceux de la MD à la fois macro- et microscopiquement. Bien que le virus de la RE soit rare dans les élevages de poulets, il ne faut pas l'oublier dans les causes potentielles de tumeurs lymphoïdes. Sa mise en évidence repose sur des examens virologiques et sérologiques de l'élevage. Le virus de la RE est également responsable de maladies néoplasiques chez la dinde, le canard, la caille et d'autres espèces. Par ailleurs, la dinde peut être infectée par un autre rétrovirus responsable également d'affections proliférantes. Même si un élevage de poulet est séropositif pour le virus de la RE, les maladies néoplasiques sont rares. Le résumé du diagnostic différentiel de la MD, de la leucose lymphoïde et de la RE est repris dans le tableau 1. La neuropathie périphérique est un syndrome qu'il est facile de confondre avec les lésions nerveuses dues au virus de MD (MDV). Cette affection n'est pas fréquente mais son incidence pourrait augmenter dans certains élevages européens (3).

Il n'existe pas de risques avérés pour l'homme dus au MDV ou aux herpèsvirus apparentés de la dinde.

Tableau 1 : Caractéristiques clés permettant le diagnostic différentiel entre la maladie de Marek, la leucose lymphoïde et la réticuloendothéliose

Caractéristique	Maladie de Marek	Leucose lymphoïde	Réticuloendothéliose*
Age	Tout âge, habituellement vers 6 semaines ou plus	Pas en dessous de 16 semaines	Pas en dessous de 16 semaines
Signes	Paralysie fréquente	Non spécifiques	Non spécifiques
Incidence	Souvent plus de 5 % dans les élevages non vaccinés Rare dans les élevages vaccinés	Rarement plus de 5 %	Rare
Lésions macroscopiques			
Atteinte nerveuse	Fréquente	Absente	Rare
Atteinte de la bourse de Fabricius	Hypertrophie diffuse ou atrophie	Tumeurs nodulaires	Tumeurs nodulaires
Tumeurs au niveau de la peau, des muscles, et du proventricule, œil gris	Parfois	Normalement absentes	Absentes
Lésions microscopiques			
Atteinte nerveuse	Oui	Non	Rare
Tumeur du foie	Souvent périvasculaire	Focale ou diffuse	Focale
Atteinte de la rate	Diffuse	Souvent focale	Focale ou diffus
Bourse de Fabricius	Tumeur interfolliculaire et /ou atrophie des follicules	Tumeurs intrafolliculaires	Tumeurs intrafolliculaires
Système nerveux central	Oui	Non	Non
Prolifération lymphoïde au niveau de la peau et des follicules plumeux	Oui	Non	Non

Cytologie des tumeurs	Cellules lymphoïdes pléiomorphes comprenant des lymphoblastes, des lymphocytes de toute taille et des cellules réticulées. Rarement des lymphoblastes seuls	Lymphoblastes	Lymphoblastes
Catégorie des cellules néoplasiques	Cellules T	Cellules B	Cellules B

* Le virus de la réticuloendothéliose peut causer plusieurs syndromes différents. Le lymphome bursal apparaît le plus souvent lorsque les animaux sont en plein air et est décrit ici.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

L'infection par le MDV peut être révélée par l'isolement viral réalisé sur des tissus de poulets infectés. Il convient de garder présent à l'esprit la nature ubiquiste du MDV et le diagnostic devra être basé sur l'association de l'isolement du virus ou de la détection du génome par PCR ainsi que sur les symptômes cliniques. Les tissus les plus utilisés sont les cellules de la fraction leucocytaire (*buffy coat*) d'échantillons de sang hépariné ou des suspensions de cellules extraites de lymphomes ou de cellules de rate. Quand ces échantillons sont prélevés sur le terrain, il est conseillé de les transporter sous froid. Le MDV étant un virus très fortement associé aux cellules, il est essentiel que les suspensions contiennent des cellules viables. Ces suspensions sont inoculées sur des cultures en monocouches de cellules rénales de poulet ou de fibroblastes embryonnaires de canard (les fibroblastes embryonnaires de poulet sont moins sensibles pour l'isolement viral primaire). Cependant, les sérotypes 2 et 3 du MDV (voir Section C.1.a) sont plus facilement isolés à partir de fibroblastes de poulet que de cellules rénales de poulet. L'inoculation est réalisée en double dans les conditions suivantes : 0,2 ml d'une suspension cellulaire contenant 10^6 à 10^7 cellules sont inoculés à des monocouches cellulaires contenues dans des puits de plaques de culture (diamètre de 60 mm). Des témoins positif et négatif sont incubés dans les mêmes conditions à 38,5 °C et en atmosphère humide sous 5 % de CO₂. Il est possible de réaliser les isolements en bouteilles de culture fermées. Le milieu doit être remplacé à intervalle de 2 jours. Des effets cytopathogènes (ECP) confinés à des zones délimitées appelées plages virales se manifestent après 3 à 5 jours. Ces plages peuvent être dénombrées au bout de 7 à 10 jours.

Un autre tissu est plus rarement utilisé pour l'isolement viral : la hampe plumifère à partir de laquelle des virions libres du MDV peuvent être isolés. Des embouts de plumes de 5 mm de long ou de minces biopsies cutanées contenant le follicule plumeux sont suspendus dans un tampon d'extraction SPGA/EDTA (sucrose, phosphate, glutamate et albumine/acide éthylène diamine tétra-acétique) pour permettre l'extraction et la titration des virions (9). La composition du tampon est la suivante : 0,218 M de saccharose (7,462 g) ; 0,0038 M de phosphate monopotassique (0,052 g) ; 0,0072 M de phosphate dipotassique (0,125 g), 0,0049 M de L-glutamate de sodium (0,083 g) ; 1 % de poudre d'albumine bovine (1,0 g), 0,2 % d'EDTA (0,2g) dans 100 ml d'eau distillée. Le tampon est stérilisé par filtration et son pH doit être de 6,5.

La suspension est soumise aux ultra-sons et filtrée sur un filtre 0,45 µm avant d'être inoculée sur des monocouches de cellules rénales de poulet fraîchement passées de 24 h. Après une période d'adsorption de 40 min, le milieu de culture est ajouté et les cultures sont incubées pendant 7 à 10 jours.

Ces méthodes permettent l'isolement des sérotypes 1 et 2 du MDV. Il est possible d'isoler le sérotype 3 du MDV (HVT) qui peut être isolé à la suite d'une vaccination. Un observateur expérimenté est capable de faire la distinction entre les plages virales induites par les différents sérotypes viraux en se basant sur la cinétique d'apparition, la rapidité d'évolution et la morphologie des plages virales. Les plages HVT apparaissent plus précocement et sont plus grandes que les plages du sérotype 1. Le sérotype 2 induit l'apparition encore plus tardive de plages plus petites que celles du sérotype 1.

L'identification des plages virales peut être réalisée grâce à des anticorps spécifiques de poulets couplés à des molécules fluorescentes. Des anticorps monoclonaux (AcM) peuvent être utilisés pour faire la distinction sérotypique (17).

• Amplification en chaîne par polymérase

Les génomes des trois sérotypes du MDV ont été séquencés (2, 18). Des réactions d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été développées pour le diagnostic du MDV et une RT-PCR en temps réel a été décrite (1, 5, 16). En outre, la différenciation entre les souches oncogènes et non-oncogènes du sérotype 1 du MDV et la distinction des souches vaccinales du MDV appartenant aux sérotypes 2 et 3 (6, 7, 15, 27, 34) ont aussi été décrites. La PCR peut également être utilisée pour quantifier la charge virale dans les tissus (5, 7, 8, 24) ou pour différencier le MDV du HVT sur les échantillons de sang ou de plumes (5, 13).

2. Épreuves sérologiques

La présence d'anticorps spécifiques du MDV chez des poulets non-vaccinés âgés de 4 semaines est révélatrice d'une infection par le MDV. Avant cette limite d'âge, les anticorps peuvent être la trace d'anticorps maternels transmis par le jaune d'œuf.

Pour les différentes épreuves décrites ci-après, les virus, antigènes et sérum peuvent être obtenus auprès des Laboratoires de référence de l'OIE spécialisés dans la MD (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Cependant, des réactifs internationaux de référence n'ont pas encore été produits.

a) Immunodiffusion en gélose

Bien qu'elle ne soit pas prescrite pour les échanges internationaux, l'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) est la plus utilisée pour la détection des anticorps envers le MDV. L'épreuve est réalisée sur des lames porte-objet recouvertes d'une solution saline tamponnée par du phosphate à 1 % d'agarose et 8 % de chlorure de sodium. Les puits adjacents sont remplis alternativement avec des sérums et de l'antigène viral. Une incubation de 24 h en atmosphère humide donne le temps à la diffusion de se produire. Les sérums positifs exhibent une réaction similaire à celle des témoins positifs. L'antigène utilisé peut être de trois types : soit il provient de culture de cellules infectées, soit il est extrait de hampes plumifères, soit il est obtenu à partir de biopsies cutanées contenant les follicules plumeux de poulets infectés. L'antigène en culture de cellules est obtenu par multiplication du MDV sur des cellules rénales de poulet ou sur des fibroblastes embryonnaires de poulets. Les cellules sont détachées et suspendues dans le milieu lorsque l'ECP a atteint sa confluence à une concentration proche de 1×10^7 cellules/ml. Il faut que le milieu de resuspension soit dépourvu de tryptose phosphate (ce dernier pourrait produire des lignes non spécifiques de précipitation). La suspension cellulaire doit subir trois cycles de congélation-décongélation pour pouvoir être utilisée comme antigène.

• Protocole

- i) Préparer une solution saline contenant 1 % de Difco Bactoagar (8 % de NaCl).
- ii) Déposer cette solution d'agarose sur une lame porte objet ou dans une boîte de Petri sur une épaisseur de 2 à 3 mm.
- iii) Découper des puits dans l'agarose solidifié en utilisant un pochoir (1 puits central et 6 puits périphériques à égale distance du puits central). Le diamètre des puits doit être de 5,3 mm. Les puits doivent être séparés d'environ 2,4 mm. Des modèles pré-découpés sont disponibles dans le commerce.
- iv) Déposer l'antigène dans le puits central et le sérum témoin dans trois puits périphériques en alternance. Les sérums à tester sont déposés dans les trois puits périphériques restants de sorte qu'une ligne de précipitation continue puisse se former entre un sérum à tester positif et le sérum témoin.
- v) Incuber les lames pendant 24 h à 37 °C dans une étuve humide. Les résultats sont visualisés sous une lampe dans une chambre noire.

Si des hampes plumifères sont utilisées pour détecter la présence du MDV, le protocole doit être adapté comme suit. Les lames sont préparées avec une solution saline (8 % NaCl) à 0,7 % d'agar avec un sérum anti-MDV inclus dans cette solution. Les hampes provenant d'oiseaux suspects de MD sont insérées verticalement dans l'agarose et l'épreuve est réalisée comme décrite plus haut. L'apparition de zones radiales de précipitation autour des hampes révèle la présence de l'antigène dans les hampes testées.

b) Autres épreuves

Il est possible de recourir à d'autres techniques pour détecter les anticorps anti-MDV comme par exemple l'immunofluorescence directe ou indirecte. Dans ces épreuves, le sérum testé va montrer ou non sa capacité à mettre en évidence des plages du MDV en culture de cellules (28, 29). Ces épreuves sont plus sensibles que l'IDG. Elles sont de plus spécifiques des sérotypes de MDV. Un test de séroneutralisation virale peut également être utilisé. Il repose sur la capacité d'un sérum à neutraliser ou non la formation de plages par des virions libres du MDV. Ce test convient davantage à des fins de recherche qu'à un but diagnostic. Des tests immuno-enzymatiques (ELISA) permettant la détection des anticorps anti-MDV ont été mis au point (10, 25, 35). L'antigène utilisé pour sensibiliser les puits des plaques de 96 puits est préparé à partir de cultures de cellules infectées par le MDV.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Le contrôle de la MD est assuré essentiellement par l'utilisation à grande échelle de vaccins à virus vivants atténués (21). Les produits biologiques commercialisés pour le contrôle du MDV sont des virus libres ou associés aux cellules du MDV ou du HVT. Des formulations nouvelles non commercialisées actuellement ont été mises au point. Il s'agit de vaccins recombinés produits par génie génétique (23). Les vaccins de la MD sont soit injectés *in ovo* aux jours 17 ou 18 de l'incubation (26), soit injecté par voie sous-cutanée au moment de l'éclosion. Les exigences pour la fabrication des vaccins sont reprises ci-dessous. Elles peuvent également être consultées au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire », ou à partir de documentations publiées pour la fabrication des vaccins à usage vétérinaire (11, 12, 19, 20, 22, 30). Les protocoles sont décrits dans la monographie 589 de la pharmacopée britannique et dans le volume 19, partie 113 du code fédéral des États-Unis d'Amérique (31). Les lignes de conduites émises par le *Manuel terrestre* sont générales. Elles doivent être mises en œuvre par les recommandations nationales ou régionales en vigueur.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Les virus du groupe MDV sont classés en trois sérotypes (MDV-1, -2 et -3) sur la base de relations antigéniques.

Sérototype 1 : il inclut toutes les souches pathogènes du virus ; elles sont classées en hypervirulentes (par ex. 648A), très virulentes (par ex. Md/5, Md/11, Ala-8, RB-1B), virulentes (par ex. HPRS-16, JM GA), moyennement virulentes (par ex. HPRS-B14, Conn A) et finalement faiblement virulentes (par ex. CU-2, CVI-988). Ces souches peuvent être atténuées par passages successifs en culture de cellules, au cours desquels elles perdent leur pouvoir pathogène mais conservent leur caractère immunogène, de manière à pouvoir être utilisées comme souches vaccinales. Deux souches atténuées par ce procédé et qui ont été mises sur le marché sont HPRS-16 et CVI-988 (Rispen). Des souches atténuées de souches hypervirulentes ont été utilisées dans des protocoles vaccinaux destinés à mettre au point des vaccins contre la forme aiguë de la maladie. Aux États-Unis d'Amérique, la souche vaccinale Md11/75C/R2/23 est une de ces souches (32) ayant reçu une autorisation de mise sur le marché. Les vaccins du sérototype 1 sont préparés sous la forme associée aux cellules (humide), et doivent par conséquent être conservés dans de l'azote liquide.

Sérototype 2 : il inclut les souches naturellement avirulentes du MDV (par ex. SB-1, HPRS-24, 301 B/1, HN-1). Plusieurs d'entre-elles ont démontré qu'elles conféraient une protection contre les souches virulentes du sérototype 1. Les souches SB-1 et 301 B/1 ont été commercialisées et sont utilisées, souvent sous la forme de vaccins bivalents associant le HVT, pour protéger les poulets contre les souches hypervirulentes. Les vaccins du sérototype 2 sont préparés uniquement sous la forme humide, et doivent par conséquent être conservés dans de l'azote liquide.

Sérototype 3 : il contient les souches naturellement avirulentes du HVT (par ex. FC126 et PB1). Ces souches sont fréquemment utilisées comme vaccins monovalents ou en combinaison avec des souches des sérotypes -1 et/ou -2. Les vaccins bi- ou trivalent sont utilisés pour la protection envers les souches hypervirulentes. Le HVT peut être préparé sous la forme de virions libres lyophilisables. Il peut cependant être préparé sous la forme associée aux cellules.

b) Méthode de culture

Les cellules utilisées pour la préparation des vaccins commercialisés sont des cultures de cellules de première explantation de fibroblastes d'embryons de poulets (CEF pour *Chicken Embryo Fibroblasts*) obtenus à partir d'élevages exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) ou de canards (DEF pour *Duck Embryo Fibroblasts*). Les CEF obtenus à partir d'élevages EOPS sont préférées aux DEF en raison de la meilleure connaissance des pathogènes touchant ces cellules et des méthodes pour les détecter.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Les méthodes permettant de tester l'indemnité de maladie des élevages EOPS sont publiées (20, 30). Les élevages de poulets EOPS doivent être indemnes des adénovirus aviaires, incluant le virus 76 (syndrome de la chute de ponte), du virus de l'encéphalomyélite aviaire, du virus de la leucose aviaire (sous-groupes A, B et J), du virus de la néphrite aviaire, des rétrovirus aviaires, des rotavirus aviaires, du virus de l'anémie du poulet, du virus de la peste aviaire, du virus de la bronchite aviaire, du virus de la bursite infectieuse, du virus de la laryngotrachéite infectieuse, des influenza virus de type A, du MDV, des *Mycoplasma*

gallisepticum et *M. synoviae*, du virus de la maladie de Newcastle, du virus de la réticuloendothéliose, de *Salmonella* spp., et du virus de la trachéite du dindon.

Les élevages de canards EOPS doivent être indemnes des adénovirus aviaires, du réovirus aviaire, de *Chlamydia*, du virus de l'entérite du canard, des virus des hépatites I et II du canard, des influenza virus de type A, du virus de la maladie de Newcastle, de *Pasteurella anatipestifer* (maintenant *Riemerella*), du virus de la réticuloendothéliose, et d'infections à *Salmonella* spp.

En cas d'émergence d'une nouvelle maladie, l'exigence d'indemnité envers cette nouvelle infection sera de mise.

L'innocuité des souches de références vaccinales sera démontrée par l'inoculation de 10 fois la dose recommandée à des poulets de 1 jour pour toute souche susceptible de causer la MD. Les poulets inoculés seront autopsiés à l'âge de 120 jours pour s'assurer de l'absence de développement de lésions macroscopiques et de lésions microscopiques étendues typiques de la MD. Il faut noter que certaines souches du MDV et du HVT peuvent provoquer des lésions nerveuses mineures et transitoires.

L'absence de réversion vers la virulence sera démontrée par la réalisation de six passages successifs de la souche vaccinale sur des poulets de 1 jour EOPS de la MD. La dose initiale administrée sera un inoculum 10 fois supérieur à celui utilisé en routine. Le passage est réalisé par transfert de sang infecté hépariné à intervalle régulier de 5 à 7 jours. Les sangs transférés sont testés pour vérifier qu'ils contiennent du virus infectieux. Les oiseaux qui se sont vus administrés le 5^e passage sont maintenus jusqu'à 120 jours. Ils sont examinés et autopsiés pour vérifier l'absence de lésions imputables au MDV. Cependant, certaines souches comme Rispens peuvent provoquer le développement de lésions mineures. Il est capital de constater qu'aucune modification de virulence n'a eu lieu pendant le passage du virus. Ce test est difficile à mettre en œuvre parce que (1) la résistance génétique des poulets a une influence importante sur la virulence apparente du virus, (2) le type d'inoculum influence également le résultat. Ces tests d'innocuité en laboratoire seront complétés par des essais de terrain à grande échelle.

Les souches de référence doivent être indemnes des agents énoncés plus haut pour les élevages EOPS. Par ailleurs, aucune trace de contaminants ou de réactifs de laboratoire ne doit être détectée. Toute souche vaccinale obtenue à partir de dindes doit en plus être indemne du virus de la maladie lymphoproliférative et du virus de l'entérite hémorragique.

Il faut déterminer l'efficacité à conférer une protection envers la MD de toute souche vaccinale, et de ses passages successifs utilisés pour la production vaccinale (généralement cinq passages au maximum sont autorisés). Les tests de protection normalisés ont été publiés. Ils comprennent la vaccination de poulets EOPS d'un jour, sensibles à la MD et la réalisation d'épreuves virulentes au moyen de souches virulentes de MD 8 jours plus tard. Les souches utilisées doivent produire la MD avec une incidence minimale de 70 % chez les poulets non vaccinés. Deux types de test sont décrits. Dans le premier, un indice de protection est calculé suite à l'administration d'une dose unique de 1 000 unités formant plages (UFP) du vaccin. Les incidences de MD faisant suite à l'épreuve virulente sont calculées dans les groupes vaccinés et témoins. L'indice de protection doit être supérieur à 80 %. Cela signifie que les animaux vaccinés montrent une réduction d'au moins 80 % d'incidence de MD macroscopique par rapport aux contrôles non vaccinés.

Un second test est décrit, il s'agit du test de la dose qui confère 50 % de protection (DP₅₀). Ce test consiste à inoculer une série de cinq dilutions de facteur 4 du virus vaccinal. Suite à l'épreuve virulente réalisée 8 jours après la vaccination, il faut repérer les deux dilutions qui confèrent d'une part plus et d'autre part moins de 50 % de protection de la MD. Il est alors possible de calculer la valeur de la DP₅₀. Ce test doit inclure une souche vaccinale de référence à titre de comparaison. La DP₅₀ peut avoir une valeur inférieure à 4 UFP. Il est possible également d'obtenir des valeurs supérieures. Les facteurs qui affectent le résultat sont les variables souche vaccinale, nature du virus vaccinal (associé au non aux cellules), présence ou absence d'anticorps maternels chez les poulets soumis aux tests. Sur la base des tests de DP₅₀, il est recommandé de fournir une dose vaccinale de terrain qui dépasse de deux valeurs le résultat obtenu, soit 1 000 UFP ou 100 DP₅₀.

Pour garantir l'efficacité et la persistance de l'immunité, des essais de terrain à grande échelle au moyen de souches vaccinales nouvelles doivent être réalisés avec des souches de MD actuelles en réalisant les essais sur différents élevages, en présence et en absence d'anticorps maternels. Des résultats expérimentaux suggèrent que l'immunité vaccinale une fois acquise perdure tout au long de la vie.

2. Méthode de fabrication

Les cultures de cellules sont réalisées dans des bouteilles à fond plat ou dans des flacons roulants en fonction du type d'incubation, stationnaire ou rotatif. Les milieux les plus utilisés sont le milieu essentiel minimum d'Eagle

(MEM) ou le milieu 199. Ils sont tamponnés par du bicarbonate de sodium et additionné de 5 % de sérum de veau. L'incubation est réalisée à 38-39 °C pendant 48 h.

Pour la fabrication des vaccins associés aux cellules, les cultures sont infectées avec une souche de MDV ou de HTV produite en stock, sous la forme associée aux cellules, généralement passée 2 fois par rapport à la souche de référence. Au terme d'une incubation de 48 h, les cellules sont récoltées par un traitement au moyen d'une solution de trypsine/EDTA qui permet le détachement des cellules. Après une brève incubation à 38 °C, le détachement cellulaire est complet. Les cellules récupérées sont centrifugées à faible vitesse et resuspendues ensuite dans un milieu de congélation. Ce milieu est constitué du milieu de culture additionné de 7,5 à 15 % de diméthylsulfoxyde (DMSO). Les cellules sont alors refroidies à 4 °C et conditionnées dans les fioles vaccinales, généralement des ampoules en verre, scellées à la flamme et congelées dans l'azote liquide.

Pour les souches de HTV, des vaccins sont disponibles sous la forme de virions libres lyophilisés. Pour leur fabrication, les cultures infectées par le HVT sont incubées pendant 72 h. Les cellules sont alors détachées comme décrit plus haut. Les cellules récoltées sont suspendues dans un petit volume de milieu de culture, centrifugée et resuspendues dans une solution tampon à 8 % de saccharose, mais dépourvue de protéine afin d'éviter la formation de mousse. La suspension cellulaire est soumise aux ultra-sons pour libérer les virions. Après avoir ôté les débris cellulaires, la solution virale est diluée dans un tampon adéquat (par ex. du SPGA). Les fioles vaccinales sont remplies et le virus est lyophilisé.

La dilution finale pour la préparation des vaccins des deux types est réalisée sur la base de l'expérience acquise lors des préparations précédentes. Il n'est pas possible de procéder au titrage d'une production avant son conditionnement. Le titrage a posteriori est réalisé sur chaque lot. L'information peut être indiquée alors sur le lot.

3. Contrôles en cours de fabrication

De manière à obtenir des résultats optimaux pour la préparation des vaccins associés aux cellules, il est essentiel d'avoir une vitesse de congélation lente (1 à 5 °C par min) et au contraire une vitesse de décongélation rapide. Le titre infectieux des cellules infectées ou des virions lyophilisés, par conséquent la dose virale par ampoule, est déterminée après remplissage des fioles.

4. Contrôles des lots

a) Identité

Afin de vérifier que le produit conditionné présente une spécificité identique à la souche de référence utilisée, des tests d'immunofluorescence indirecte (IFI) avec un sérum monospécifique doivent être réalisés. Des anticorps monoclonaux sont le plus souvent utilisés.

b) Innocuité et stérilité

Il est nécessaire de procéder à plusieurs tests qui démontrent la sécurité du vaccin et du produit fini. Les cellules sur lesquelles sont produits les vaccins doivent provenir d'élevages EOPS, surtout indemnes d'agents pathogènes transmis par voie verticale. Toutes les substances d'origine animale (sérum, trypsine, et albumine sérique bovine) utilisées pendant le processus de fabrication doivent aussi être exemptes d'agents infectieux.

Les lots de vaccins produits doivent être testés pour toute contamination par les levures, bactéries, mycoplasmes et virus énoncés pour les élevages EOPS. La pureté du produit doit également être démontrée. Les tests adéquats à chaque étapes du processus de fabrication doivent être réalisés tels que recommandés par les organismes officiels (20, 22, 30) et dans le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

Dix doses de vaccins ou une quantité équivalente de dilutions de deux doses vaccinales doivent être inoculées à des groupes séparés de 10 poulets EOPS d'un jour. Aucun effet indésirable ne peut apparaître dans les 21 jours qui suivent l'administration.

c) Activité

La norme pour la dose de chaque type de vaccin est 1 000 UFP par poulet ou par œuf. Des titrages viraux sont réalisés sur les lots de vaccins conditionnés afin de garantir la dose pour chaque oiseau vacciné.

d) Durée de l'immunité

Les tests de durée d'immunité ne doivent être réalisés que sur les souches de référence. L'immunité conférée par ce vaccin devrait perdurer à vie.

e) Stabilité

Des tests de stabilité sont réalisés sur six lots représentatifs de chaque vaccin pour démontrer le maintien du titre infectieux dans les vaccins conditionnés. Les tests doivent être réalisés dans les conditions de stockage habituelles du vaccin. Les produits lyophilisés doivent avoir une durée de conservation de 12 mois s'ils sont conservés entre 2 et 8 °C. Le fabricant peut doubler le contenu viral du vaccin pour compenser les pertes occasionnées par un stockage de longue durée. Un liquide de dilution est fourni par les fabricants pour les deux formes vaccinales (liquide et lyophilisée). La stabilité du vaccin resuspendu doit avoir été testée pendant une période de 2 h.

f) Agents de conservation

Aucun agent de conservation n'est ajouté dans les vaccins ou les diluants.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Des précautions particulières doivent être mises en œuvre pour la manipulation des vaccins associés aux cellules lorsqu'ils sont retirés de l'azote liquide afin d'éviter toute blessure liée aux explosions fortuites qui se produisent à la décongélation. Il est recommandé de porter des lunettes de protection. Les vaccins reconstitués doivent être maintenus au froid pendant leur utilisation. Les formes associées aux cellules doivent être agitées pour maintenir les suspensions cellulaires homogènes.

5. Contrôles du produit fini**a) Innocuité**

Voir section C.4.b.

b) Activité

Voir section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABDUL-CAREEM M.F., HUNTER B.D., NAGY E., READ L.R., SANEI B., SPENCER J.L. & SHARIF S. (2006). Development of a real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome load in feather tips. *J. Virol. Methods*, **133** (1), 34–40.
2. AFONSO C.L., TUMLIN E.R., LU Z., ZSAK L., ROCK D.L. & KUTISH G.F. (2001). The genome of turkey herpesvirus. *J. Virol.*, **75**, 971–978.
3. BACON L.D., WITTER R.L. & SILVA R.F. (2001). Characterization and experimental reproduction of peripheral neuropathy in white leghorn chickens. *Avian Pathol.*, **30**, 487–499.
4. BAIGENT S.J. & DAVISON F. (2004). Marek's disease virus: biology and life cycle. *In: Marek's disease: An Evolving Problem*, Davison F. & Nair V., eds. Elsevier Academic Press, London, UK, 62–77.
5. BAIGENT S.J., PETHERBRIDGE L.J., HOWES K., SMITH L.P., CURRIE R.J.W. & NAIR V. (2005). Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. *J. Virol. Methods*, **123**, 53–64.
6. BECKER Y., ASHER Y., TABOR E., DAVIDSON I., MALKINSON M. & WEISMAN Y. (1992). Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease virus (MDV) and vaccine viruses of MDV-serotypes 2 and 3. *J. Virol. Methods*, **40**, 307–322.
7. BUMSTEAD N., SILLIBOURNE J., RENNIE M., ROSS N. & DAVISON F. (1997). Quantification of Marek's disease virus in chicken lymphocytes using the polymerase chain reaction with fluorescence detection. *J. Virol. Methods*, **65**, 75–81.
8. BURGESS S.C. & DAVISON T.F. (1999). A quantitative duplex PCR technique for measuring amounts of cell-associated Marek's disease virus: differences in two populations of lymphoma cells. *J. Virol. Methods*, **82**, 27–37.
9. CALNEK B.W., HITCHNER S.B. & ADLINDER H.K. (1970). Lyophilization of cell-free Marek's disease herpesvirus and a herpesvirus from turkeys. *Appl. Microbiol.*, **20**, 723–726.
10. CHENG Y.-Q., LEE L.F., SMITH E.J. & WITTER R.L. (1984). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to Marek's disease virus. *Avian Dis.*, **28**, 900–911.

11. COUNCIL OF EUROPE (1997). Marek's Disease Vaccines (Live). *In: European Pharmacopoeia, Third Edition. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 1814–1818. ISBN 92-871-2990-8.*
12. COUNCIL OF EUROPE (1997). Vaccines for Veterinary Use. Chapter 5.2.2. Chicken flocks free from specified pathogens for the production and quality control of vaccines. *In: European Pharmacopoeia, Third Edition. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 301–304. ISBN 92-871-2990-8.*
13. DAVIDSON I. & BORENSHTAIN R. (2002). The feather tips of commercial chickens are a favourable source of DNA for the amplification of MDV and ALV-J. *Avian Pathol.*, **31**, 237–240.
14. DAVISON F. & NAIR V., EDS. (2004). Marek's disease: An Evolving Problem. Elsevier Press, Amsterdam, the Netherlands and Boston, USA.
15. HANDBERG K.J., NIELSON O.L. & JORGENSEN P.H. (2001). Use of serotype 1 & serotype 3 specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens. *Avian Pathol.*, **30**, 243–249.
16. ISLAM A., HARRISON B., CHEETHAM B.F., MAHONY T.J., YOUNG P.L. & WALKDEN-BROWN S.W. (2004). Differential amplification and quantitation of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **119** (2), 103–113.
17. LEE L.F., LIU X. & WITTER R.L. (1983). Monoclonal antibodies with specificity for three different serotypes of Marek's disease virus in chickens. *J. Immunol.*, **130**, 1003–1006.
18. LEE L.F., WU P., SUI D., REN D., KAMIL J., KUNG H.J. & WITTER R.L. (2000). The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **97**, 6091–6096.
19. MERIEUX C., HULSE E.C., GAUDRY D., ALLAN W.H., REGAMEY R.H., EDS (1974). International Symposium on Requirements for Poultry Virus Vaccines. Proceedings of the 42nd Symposium, International Association of Biological Standardization, Lyon, France, August 1973. *Dev. Biol. Stand.*, **25**, 423.
20. MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (1990). Guidelines for the Production and Control of Avian Virus Vaccine. MAL 74. HMSO, London, UK.
21. NAIR V. (2004). Successful control of Marek's disease by vaccination. *In: Control of Infectious Animal Diseases by Vaccination*, Schudel A. & Lombard M., eds. Dev. Biol. (Karger, Basel, Switzerland), **119**, 147–154.
22. OFFICE OF FEDERAL REGULATIONS (1989). Animals and Animal Products. Code of Federal Regulations, Vol. 9. National Archives of the United States, USA.
23. REDDY S.K., SHARMA J.M., AHMAD J., REDDY D.N., McMILLEN J.K., COOK S.M., WILD M.A. & SCHWARTZ R.D. (1996). Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an *in ovo* vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens. *Vaccine*, **14**, 469–477.
24. REDDY S.M., WITTER R.L. & GIMENO I.M. (2000). Development of a quantitative-competitive polymerase chain reaction assay for serotype 1 Marek's disease virus. *Avian Dis.*, **44**, 770–775.
25. SHARMA J.M. (1998). Marek's disease. *In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th Edition. Swayne D.E. *et al.*, eds. American Association of Avian Pathologists, 116–124.
26. SHARMA J.M. (1999). Introduction to poultry vaccines and immunity. *Adv. Vet. Med.*, **41**, 481–494.
27. SILVA R.F. (1992). Differentiation of pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDVs) by the polymerase chain reaction amplification of the tandem direct repeats within the MDV genome. *Avian Dis.*, **36**, 521–528.
28. SILVA R.F., CALVERT J.G. & LEE L.F. (1997). A simple immunoperoxidase plaque assay to detect and quantitate Marek's disease virus plaques. *Avian Dis.*, **41**, 528–534.
29. SPENCER J.L. & CALNEK B.W. (1970). Marek's disease: application of immunofluorescence for detection of antigen and antibody. *Am. J. Vet. Res.*, **31**, 345–358.
30. THORNTON D.H. (1985). Quality control and standardisation of vaccines. *In: Marek's Disease*, Payne L.N. ed. Martinus Nijhoff, Boston, USA, 267–291.
31. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (1995). Code Of Federal Regulations, Title 9, Parts 1–199. US Government Printing Office, Washington D.C., USA.
32. WITTER R.L. (2001). Protective efficacy of Marek's disease vaccines. *In: Marek's disease*, Hirai K., ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 58–90.

33. WITTER R.L. & SCHAT K.A. (2003). Marek's disease. *In: Diseases of Poultry*, Eleventh Edition, Saif Y.M. *et al.*, eds. Iowa State University Press, Ames Iowa, USA, 407–465.
34. ZHU G.-S., OJIMA T., HIRONAKA T., IHARA T., MIZUKOSHI N., KATO A., UEDA S. & HIRAI K. (1992). Differentiation of oncogenic and non-oncogenic strains of Marek's disease virus type 1 by using polymerase chain reaction DNA amplification. *Avian Dis.*, **36**, 637–645.
35. ZELNIK V., HARLIN O., FEHLER F., KASPERS B., GOEBEL T. W., NAIR V. & OSTERRIEDER N. (2004). an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of marek's disease virus-specific antibodies and its application in an experimental vaccine trial. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, **51**, 61–67.

*

* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la maladie de Marek (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

MALADIE DE NEWCASTLE

RÉSUMÉ

La maladie de Newcastle (MN) est due à un paramyxovirus aviaire de sérotype 1 (APMV-1), du genre Avulavirus, appartenant à la famille des Paramyxoviridae. Il existe 9 sérotypes de paramyxovirus aviaires appelés APMV-1 à APMV-9.

Il a été montré que le virus de la MN pouvait infecter plus de 200 espèces d'oiseaux mais la sévérité de la maladie varie considérablement selon l'hôte et la souche virale impliquée. Les souches les moins virulentes peuvent induire une maladie grave en présence d'autres micro-organismes ou de certaines conditions environnementales. La méthode de diagnostic préférée est l'isolement du virus suivi de sa caractérisation.

Identification de l'agent pathogène : *des suspensions préparées dans une solution d'antibiotiques à partir d'écouvillonnages trachéaux et cloacaux (ou de matières fécales) pour les oiseaux vivants, ou à partir de matières fécales et de prélèvements d'organes regroupés pour les sujets morts, sont inoculées dans la cavité allantoïque d'œufs de poule embryonnés, de 9 à 11 jours. Les œufs sont mis à incuber à 37 °C pendant 4 à 7 jours. Les œufs contenant des embryons morts ou moribonds (à mesure qu'ils apparaissent) et tous les œufs restants à la fin de la période d'incubation sont examinés pour rechercher l'activité hémagglutinante dans le liquide allantoïque.*

Toutes les substances hémagglutinantes doivent être testées pour rechercher l'inhibition spécifique avec un antisérum monospécifique dirigé contre le virus de la MN. Ce virus (APMV-1) peut présenter certaines relations antigéniques croisées avec d'autres sérotypes de paramyxovirus aviaires, notamment APMV-3 et APMV-7.

Le pouvoir pathogène de tout virus nouvellement isolé peut être évalué en déterminant l'indice de pathogénicité intracérébrale. Le pouvoir pathogène des souches isolées peut également être évalué à l'aide de techniques moléculaires telles que la transcription inverse couplée à une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) et le séquençage. Dans la plupart des pays, la MN est l'objet d'un contrôle : les risques de propagation du virus à partir d'un laboratoire étant élevés, il importe que les règles appropriées de biosécurité et de biosûreté soient respectées. Une évaluation du risque doit être effectuée pour déterminer le niveau de confinement approprié.

Épreuves sérologiques : *l'inhibition de l'hémagglutination est très largement utilisée pour la recherche sérologique de la MN. Son utilité diagnostique dépend du statut immunitaire vaccinal des oiseaux examinés et des conditions sanitaires qui prévalent.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *selon la situation sanitaire, la vaccination des volailles repose sur l'utilisation de virus vivants faiblement virulents (lentogènes) ou modérément virulents (mésogènes). On utilise également des vaccins inactivés.*

Différentes voies d'administration peuvent être utilisées chez les volailles pour les vaccins vivants. Les vaccins sont généralement produits en recueillant les liquides infectieux allantoïques/amniotiques après inoculation d'œufs de poule embryonnés ; certains sont préparés à partir de cultures cellulaires infectées. Le produit fini est obtenu en portant les semences primaires et les semences de travail au volume voulu pour la production.

Les vaccins inactivés sont administrés par voie intramusculaire ou sous-cutanée. Ils sont généralement produits par addition de formol aux préparations virales infectieuses ou par

traitement à la bêta-propiolactone. La plupart des vaccins inactivés sont présentés en émulsion dans une huile minérale ou végétale.

Si des virus pathogènes de la MN sont utilisés pour produire des vaccins ou effectuer des épreuves virulentes, les installations doivent répondre aux exigences de l'OIE en matière de confinement des agents pathogènes (classe 4).

A. INTRODUCTION

La maladie de Newcastle (MN) est due à un paramyxovirus aviaire de sérotype I (APMV-I), du genre *Avulavirus*, appartenant à la sous-famille des Paramyxovirinae et à la famille des Paramyxoviridae. Les paramyxovirus isolés des espèces aviaires ont été classés d'après les épreuves sérologiques en 9 sérotypes appelés APMV-1 à APMV-9 ; le virus de la MN est connu sous la dénomination « APMV-1 » (6).

Depuis son identification en 1926, la MN est considérée comme enzootique dans de nombreux pays. La vaccination préventive est pratiquée dans presque tous les pays qui produisent des volailles à l'échelle industrielle.

L'une des caractéristiques majeures du virus est la forte variation du pouvoir pathogène des différentes souches virales chez les poulets. Les souches virales ont été classées en 5 pathotypes sur la base des signes cliniques observés chez les poulets infectés (15), à savoir :

1. les souches viscérotropes vélogènes hautement pathogènes qui provoquent fréquemment des lésions intestinales hémorragiques ;
2. les souches neurotropes vélogènes qui provoquent une forme se caractérisant par une mortalité massive, généralement à la suite de signes respiratoires et nerveux ;
3. les souches mésogènes qui provoquent une forme se caractérisant par des signes respiratoires, des signes nerveux occasionnels mais une faible mortalité ;
4. les souches lentogènes ou respiratoires qui provoquent une forme se traduisant par une infection respiratoire mineure ou infraclinique ;
5. les souches asymptomatiques entériques qui provoquent une forme se traduisant généralement par une infection intestinale infraclinique.

Le classement par pathotypes produit rarement des catégories bien distinctes (7) et même les infections provoquées chez des oiseaux indemnes d'organismes pathogènes spécifiques peuvent donner lieu à des chevauchements considérables. Il peut aussi se produire une exacerbation des signes cliniques induits par les souches les moins virulentes en cas d'infection concomitante par d'autres micro-organismes ou en présence de certaines conditions environnementales.

Étant donné que les manifestations cliniques varient considérablement chez les poulets et que le diagnostic peut être compliqué par la variabilité des réponses entre les hôtes, les signes cliniques ne sont pas suffisants pour poser un diagnostic de MN. Les signes et les lésions typiquement associés aux pathotypes virulents feront toutefois fortement suspecter la maladie.

Le virus de la MN est aussi pathogène pour les humains. Les infections signalées n'ont jamais menacées le pronostic vital et ne furent en général pas débilitantes pour plus d'un ou deux jours (18). Les symptômes les plus fréquemment signalés et bien documentés chez les humains sont des infections oculaires, consistant en une rougeur uni- ou bilatérale, un larmoiement excessif, un œdème des paupières, une conjonctivite et des hémorragies sous-conjonctivales. Bien que les troubles oculaires puissent être parfois sérieux, l'infection est le plus souvent transitoire et il n'y a pas d'atteinte de la cornée. D'autres symptômes chez des humains infectés sont moins bien documentés mais ils laissent à penser qu'une infection généralisée peut survenir avec des frissons, des maux de tête et de la fièvre, avec ou sans conjonctivite. Il existe des preuves que les souches de virus de la MN, tant les souches vaccinales que les souches virulentes (pour les volailles), peuvent provoquer des symptômes chez les humains. Il n'y a pas de preuve de transmission d'homme à homme.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

La MN, telle qu'elle est définie dans la Section B.1 de ce chapitre, est soumise à des contrôles officiels dans la plupart des pays et le risque de propagation du virus à partir d'un laboratoire est élevé ; une évaluation des risques doit, par conséquent, être effectuée pour déterminer le niveau approprié de biosécurité et de biosûreté à respecter pour le diagnostic et la caractérisation du virus. Les locaux doivent respecter les normes du groupe de confinement défini par l'évaluation des risques et décrits dans le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries » de ce *Manuel terrestre*. Les pays qui ne possèdent pas de laboratoire spécialisé aux niveaux national ou régional doivent envoyer les prélèvements à un Laboratoire de référence de l'OIE.

a) Prélèvements destinés à l'isolement du virus

Lorsque la MN est recherchée en présence d'une maladie sévère et d'une mortalité massive dans un élevage de poulets, il est habituel de tenter d'isoler le virus chez des oiseaux morts récemment ou bien trouvés moribonds et mis à mort dans des conditions décentes. Prélèvements à effectuer chez les oiseaux morts : écouvillonnages de la sphère oro-nasale et prélèvements tissulaires sur les poumons, les reins, l'intestin (y compris le contenu), la rate, le cerveau, le foie et le cœur. Ces prélèvements peuvent être recueillis séparément ou bien regroupés, quoique les prélèvements intestinaux soient généralement traités à part.

Les prélèvements à effectuer chez les oiseaux vivants doivent inclure à la fois des écouvillonnages trachéaux et cloacaux, ces derniers devant être visiblement enrobés de matières fécales. Les oiseaux petits et fragiles peuvent être lésés par l'écouvillonnage et le recueil de matières fécales fraîches peut constituer une alternative correcte.

Lorsque la possibilité d'obtenir des prélèvements est limitée, il est important d'examiner des écouvillonnages cloacaux (ou des matières fécales) et des écouvillonnages trachéaux (ou du tissu trachéal) ainsi que des organes et des tissus apparaissant lésés à l'œil nu ou connus pour être associés aux formes cliniques de la maladie. Les échantillons doivent être prélevés aux stades précoces.

Les prélèvements sont placés dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) isotonique, de pH 7,0 à 7,4, additionné d'antibiotiques. Les milieux à base de protéines, tels qu'une infusion cœur-cerveau (BHI = *brain-heart infusion*) ou un bouillon tryptose tamponné (TBTB = *tris-buffered tryptose broth*) ont aussi été utilisés et donnent de la stabilité au virus, notamment au cours du transport. Les antibiotiques peuvent varier selon les conditions locales. On peut utiliser par exemple la pénicilline (2 000 unités/ml), la streptomycine (2 mg/ml), la gentamycine (50 µg/ml) et la mycostatine (1 000 unités/ml) pour les tissus et les écouvillonnages trachéaux, mais il faut des concentrations 5 fois plus élevées pour les matières fécales et les écouvillonnages cloacaux. Il est important de réajuster la solution à pH 7,0-7,4 après avoir ajouté les antibiotiques. Pour contrôler *Chlamydomphila*, il convient d'ajouter 0,05 à 0,1 mg/ml d'oxytétracycline. Les matières fécales et les coupes tissulaires minces doivent être préparées sous forme de suspensions à 10-20 % (p/v) dans la solution d'antibiotiques. Les suspensions doivent être traitées dès que possible après incubation pendant 1 à 2 h à température ambiante. Lorsqu'il n'est pas possible de traiter les prélèvements immédiatement, ceux-ci peuvent être conservés à 4 °C pendant un maximum de 4 jours.

b) Culture du virus

Les surnageants des matières fécales ou des suspensions tissulaires, obtenus par une clarification par centrifugation à 1 000 *g* pendant environ 10 min à une température ne dépassant pas 25 °C, sont inoculés sous des volumes de 0,2 ml dans la cavité allantoïque d'au moins cinq œufs de poule embryonnés, indemnes d'organismes pathogènes spécifiques, incubés pendant 9 à 11 jours. Après inoculation, les œufs sont mis à incuber à 35 ou 37 °C pendant 4 à 7 jours. Les œufs contenant des embryons morts ou moribonds (à mesure qu'ils apparaissent) et tous les œufs restants à la fin de la période d'incubation doivent être refroidis à 4 °C afin de rechercher l'activité hémagglutinante dans le liquide allantoïque. Les liquides allantoïques donnant une réaction négative doivent être repassés sur une nouvelle série d'œufs.

c) Identification du virus

L'activité hémagglutinante décelée dans les liquides bactériologiquement stériles recueillis sur des œufs inoculés peut être due à la présence de n'importe lequel des 16 sous-types d'hémagglutinine du virus de l'influenza A ou à l'un des 8 autres sérotypes de paramyxovirus (un liquide non stérile pourrait contenir de l'hémagglutinine bactérienne). Le virus de la MN peut être confirmé par l'utilisation d'antisérum spécifique dans un test d'inhibition de l'hémagglutination. On utilise généralement de l'antisérum de poulet dirigé contre une souche du virus de la MN.

Les réactions croisées se produisant dans les tests d'inhibition de l'hémagglutination entre le virus de la MN et certains autres paramyxovirus aviaires, notamment les sérotypes APMV-3 et APMV-7, risquent d'être sources de problèmes qui se résolvent en utilisant des antigènes et des antisérums témoins appropriés.

d) Indice de pathogénicité

Compte tenu de la très forte variation de virulence entre les différentes souches virales isolées et de la large utilisation des vaccins vivants, l'identification d'une souche en tant que virus de la MN chez des oiseaux présentant des signes cliniques ne confirme pas ce diagnostic. Il est par conséquent également indispensable d'évaluer la virulence de la souche (voir la Section B.1.f ci-après intitulée « Définition de la maladie de Newcastle »). Dans le passé, des tests comme le délai moyen de l'effet léthal sur des embryons de poulets, l'indice de pathogénicité intraveineuse ou des variations de ces tests ont été utilisés (27), mais après accord international, l'évaluation définitive de la virulence du virus repose sur l'indice de pathogénicité intracérébrale. La définition actuelle de l'OIE (voir la Section B.1.f) reconnaît aussi les avancées dans la compréhension des bases moléculaires du pouvoir pathogène et autorise la confirmation de la virulence (mais pas l'absence de virulence) par des tests *in vitro* qui analysent la séquence des acides aminés du site de clivage de la protéine F0.

• Indice de pathogénicité intracérébrale

- i) Du liquide allantoïque infectieux frais présentant une activité hémagglutinante de titre $>2^4$ ($>1/16$) est dilué au 1/10 dans du soluté isotonique de chlorure de sodium stérile, sans autres additif du type antibiotique.
- ii) Un volume de 0,05 ml de la dilution virale est injecté par voie intracérébrale chez 10 poussins issus d'œufs provenant d'un élevage indemne d'organismes pathogènes spécifiques. Les poussins doivent avoir plus de 24 h et moins de 40 h au moment de l'inoculation.
- iii) Ils sont ensuite examinés toutes les 24 h pendant 8 jours.
- iv) À chaque observation, le score suivant est attribué : 0 si l'état est normal, 1 si le poussin est malade et 2 s'il est mort (les oiseaux vivants mais incapables de s'alimenter ou de boire doivent être euthanasiés et enregistrés comme morts lors de l'observation suivante. Pour les poussins morts, le chiffre 2 doit être réattribué lors de chacune des cotations journalières restantes).
- v) L'indice de pathogénicité intracérébrale est le score moyen obtenu par poussin et par observation sur cette période de 8 jours.

Les virus les plus virulents donnent des indices qui approchent le score maximal de 2,0 alors que les souches lentogènes et entériques asymptomatiques donnent des valeurs proches de 0,0.

e) Bases moléculaires du pouvoir pathogène

Lors de la réplication, les particules du virus de la MN sont produites à partir d'un précurseur, F0, de la glycoprotéine, qui doit être clivé en F1 et F2 pour que les particules virales deviennent infectieuses. Ce clivage post-translationnel est médié par des protéases de la cellule hôte. La trypsine est capable de cliver F0 sur toutes les souches virales de la MN.

Il semble que les molécules F0 des virus virulents chez les poulets puissent être clivées par une ou plusieurs protéases de l'hôte, présente(s) dans toute une série de cellules et de tissus ; ces molécules peuvent ainsi se propager chez l'hôte en endommageant les organes vitaux. Le clivage des molécules F0 des virus faiblement virulents est en revanche conditionné par la présence de certaines protéases de l'hôte, de sorte que ces virus se multiplient uniquement dans certains types de cellules hôtes.

Sur la plupart des virus de la MN qui sont pathogènes pour les poulets, on constate la présence de la séquence $^{112}\text{R/K-R-Q-K/R-R}^{116}$ sur la fraction C-terminale de la protéine F2, et de F (phénylalanine) sur le résidu 117, c'est-à-dire la fraction N-terminale de la protéine F1 ; sur les virus de faible virulence on observe la présence de séquences $^{112}\text{G/E-K/R-Q-G/E-R}^{116}$ dans la même région et de L (leucine) au résidu 117. Sur certains variants trouvés chez le pigeon (PPMV-1), on a observé la séquence $^{112}\text{G-R-Q-K-R-F}^{117}$, mais avec des indices élevés de pathogénicité intracérébrale. Ainsi, pour que le virus soit virulent pour les poulets, il apparaît nécessaire qu'existe au moins une paire d'acides aminés basiques aux résidus 116 et 115, en plus d'une phénylalanine au résidu 117 et d'un acide aminé basique (R) au 113.

Plusieurs études ont été réalisées à l'aide de techniques moléculaires pour déterminer la séquence du site de clivage de F0 en utilisant la transcription inverse couplée à une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR), soit sur le virus isolé, soit sur des tissus et des matières fécales provenant d'oiseaux infectés. Le produit a été soumis à une analyse par enzyme de restriction, à une hybridation par sonde ou à un séquençage nucléotidique, en vue d'établir un test *in vitro* de routine pour le contrôle de la virulence (voir la référence 2 pour une revue de la littérature). La détermination de la séquence de clivage de F0 peut donner

une indication claire de la virulence du virus. Aussi, cette notion a-t-elle été intégrée à la définition de la MN (voir la Section B.1.f).

Dans le diagnostic de la MN, la mise en évidence d'un virus comportant de multiples acides aminés basiques au site de clivage de F0 confirme la présence d'un virus virulent ou potentiellement virulent. Il est important de souligner en revanche qu'il ne faut pas conclure à l'absence de virus virulent en cas de non détection du virus ou en cas de caractérisation d'un virus de la MN dénué d'acides aminés basiques multiples au site de clivage de F0, à l'aide des techniques moléculaires. S'il y a mésappariement de l'amorce ou en présence d'une population mélangée de virus virulents et non virulents, il restera nécessaire d'isoler le virus et d'en évaluer la virulence *in vivo*.

Des analyses récentes sur des virus isolés en Irlande en 1990 ou trouvés lors des épisodes survenus en Australie depuis 1998, ont démontré que les virus virulents peuvent provenir de virus progéniteurs de faible virulence (5, 45). Des virus virulents de la MN ont également été générés expérimentalement à partir de virus de faible virulence par passage chez des poulets (39).

f) Définition de la maladie de Newcastle

Il semble probable que la grande majorité des oiseaux soient sensibles aux infections par les souches virales de la MN fortement ou faiblement virulentes pour les poulets. Les signes cliniques observés chez les oiseaux infectés par ces virus varient cependant considérablement et dépendent de facteurs tels que le virus, l'espèce hôte, l'âge de l'hôte, les infections par d'autres micro-organismes, les stress environnementaux et le statut immunitaire. Dans certaines circonstances, les infections par des virus extrêmement virulents peuvent se traduire par une mortalité massive soudaine, avec relativement peu de signes cliniques. Ainsi, les signes cliniques sont variables et dépendent d'autres facteurs, et aucune manifestation ne peut être considérée comme pathognomonique.

Même chez les hôtes sensibles comme les poulets, le virus de la MN présente une très large fourchette de virulence. Généralement, les tests utilisés pour évaluer la virulence montrent un regroupement par « grappes » autour des deux extrêmes mais, pour toute une série de raisons, certains virus peuvent présenter une virulence intermédiaire.

Compte tenu des variations considérables qui apparaissent au niveau de la virulence et des signes cliniques, il convient de définir soigneusement les éléments constitutifs de la MN pour les besoins des échanges commerciaux, des mesures de prophylaxie et des politiques réglementaires. La définition de la MN actuellement utilisée dans tous les États membres de l'Union européenne est définie par la Directive 92/66/CEE (20).

La définition utilisée par l'OIE pour la déclaration des foyers de MN contient les éléments suivants :

« La maladie de Newcastle est définie comme une infection des volailles causée par à un paramyxovirus aviaire de sérotype 1 (APMV-1), qui présente un des critères de virulence suivants :

- a. le virus possède un indice de pathogénicité intracérébrale (IPIC) d'au moins 0,7 pour les poussins (Gallus gallus) d'un jour, ou*
- b. la présence de multiples acides aminés basiques a été démontrée (directement ou par déduction), au niveau de la fraction C-terminale de la protéine F2, ainsi que celle de la phénylalanine au niveau du résidu 117 de la fraction N-terminale de la protéine F1. L'expression « multiples acides aminés basiques » se réfère à la présence d'au moins trois acides aminés correspondant à l'arginine ou à la lysine entre les résidus 113 et 116. En l'absence de la démonstration de la présence de multiples acides aminés basiques tels que décrits ci-dessus, il convient de caractériser le virus isolé en déterminant l'indice de pathogénicité intracérébrale.*

Dans cette définition, les résidus d'acides aminés sont numérotés à partir de la fraction N-terminale de la séquence amino-acide déduite de la séquence nucléotidique du gène F0, et les résidus 113-116 correspondent aux résidus –4 à –1 à partir du site de clivage. »

g) Anticorps monoclonaux

Des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre des souches du virus de la MN ont été utilisés dans les tests d'inhibition de l'hémagglutination pour permettre une identification rapide du virus, en excluant les réactions croisées avec d'autres sérotypes de paramyxovirus aviaires, qui peuvent survenir avec du sérum polyclonal. Certains travaux ont permis de produire des anticorps monoclonaux donnant lieu, dans les tests d'inhibition de l'hémagglutination, à des réactions spécifiques de certaines souches particulières ou de certains variants du virus de la MN (6, 10).

Des séries d'anticorps monoclonaux ont été utilisées pour établir les profils antigéniques des souches virales, sur la base de la présence ou de l'absence de réaction avec les virus. Cette méthode s'est révélée intéressante pour classer et différencier les souches du virus de la MN, et elle a été particulièrement utile pour comprendre l'épidémiologie des foyers (10).

h) Études phylogénétiques

Les études phylogénétiques se sont multipliées au cours des dernières années en raison de l'amélioration des techniques de séquençage nucléotidique, du développement de bases de données informatisées précisant les séquences d'un nombre croissant de virus et des travaux montrant que des séquences même relativement courtes pourraient donner des résultats significatifs dans les analyses phylogénétiques. Une diversité génétique considérable a été détectée, mais les virus partageant différentes caractéristiques temporelles, géographiques, antigéniques ou épidémiologiques tendent à faire partie de lignées ou de clades spécifiques, ce qui s'est révélé utile à l'évaluation aussi bien de l'épidémiologie mondiale que de la propagation locale de la maladie (4, 8, 19, 28, 32, 33, 38, 41, 43, 44).

Alors que par le passé il était impossible de recourir aux analyses phylogénétiques comme à des outils de routine, les laboratoires ont aujourd'hui plus largement accès aux kits sophistiqués commercialisés pour la RT-PCR ainsi qu'aux séquenceurs automatiques, avec des résultats de plus en plus rapides. Les laboratoires sont ainsi beaucoup plus nombreux à pouvoir assurer ces études qui fournissent des données significatives en temps réel et non plus seulement *a posteriori* (2). Aldous *et al.* (4) ont proposé que le géotypage des souches de virus de la MN devienne partie intégrante du diagnostic et de la caractérisation pour les Laboratoires de référence en produisant une séquence du gène F de 375 nucléotides comprenant le site de clivage F0, et en comparant en routine les séquences obtenues avec d'autres souches isolées et 18 virus représentatifs des lignées et des sous-lignées reconnues actuellement. Une telle analyse permettrait une estimation rapide de l'origine et de l'extension des virus responsables des foyers de MN.

i) Techniques moléculaires utilisées pour le diagnostic

Outre la RT-PCR et d'autres techniques analogues utilisées pour déterminer la virulence des souches du virus de la MN (voir la Section B.1.e) ou pour réaliser des études phylogénétiques (voir la Section B.1.h), plusieurs rapports ont fait état du recours croissant à ce type de techniques moléculaires pour déceler le virus dans les prélèvements cliniques. Ces approches présentent l'avantage de détecter le virus très rapidement.

Les prélèvements cliniques doivent être soigneusement sélectionnés car certaines études ont montré un manque de sensibilité lors de la détection du virus dans certains organes et notamment dans les matières fécales (23, 25, 30). Les échantillons trachéaux ou oro-pharyngés sont souvent des échantillons de choix car ils sont facilement traités et contiennent, en général, peu de matériel organique qui pourrait interférer avec la détection et l'amplification de l'ARN par PCR. Cependant, des échantillons de tissus ou d'organes, et même de matières fécales, ont été utilisés avec succès. Le procédé d'extraction de l'ARN peut aussi influencer le résultat de la RT-PCR sur des échantillons cliniques et, même avec des kits commerciaux, il convient de choisir avec soin le plus approprié pour l'analyse des échantillons sélectionnés.

En général, les systèmes de RT-PCR ont été utilisés pour amplifier une fraction spécifique du génome qui apporte une valeur supplémentaire comme, par exemple en amplifiant la partie du gène F qui comprend le site de clivage F0 ce qui permet d'utiliser le produit d'amplification pour évaluer la virulence (3, 14, 23, 25, 29, 37, 38). Le plus sérieux problème de l'utilisation de la RT-PCR pour le diagnostic est la nécessité du traitement après amplification, en raison des risques élevés de la contamination au laboratoire ou des contaminations croisées entre échantillons. Le plus grand soin doit être apporté et un protocole très strict doit être suivi lors de la manipulation des échantillons (voir Chapitre 1.1.5., « Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses »). Comme pour la détermination de la virulence, il est important que ces techniques ne soient pas utilisées seules pour conclure à la négativité des recherches en cas de suspicion de la MN.

Une des stratégies possibles pour éviter le traitement après amplification est d'utiliser des techniques de RT-PCR en temps réel. Ces techniques étant basées sur des sondes fluorogéniques ou des colorants fluorescents, le traitement après amplification n'est plus nécessaire et le résultat peut alors être obtenu en moins de 3 h. La réussite la plus spectaculaire de l'utilisation de la RT-PCR en temps réel a été aux États-Unis d'Amérique pendant les foyers de MN de 2002 et 2003, quand l'épreuve décrite par Wise *et al.* (46) a montré une sensibilité de 95 % lors de comparaison avec l'isolement du virus sur plus de 1 400 prélèvements. L'épreuve comprend trois paires d'amorces et de sondes qui sont utilisées dans des réactions séparées : une paire amorce/sonde de matrice qui est prévue pour détecter la plupart des souches de virus de la MN, une paire d'amorce/sonde de fusion qui peut identifier les souches virulentes (y compris beaucoup de virus PPMV-1) et une paire d'amorce/sonde pour la détection des souches faiblement virulentes. Les échantillons sont d'abord criblés avec les amorces/sondes de matrice. Les échantillons positifs sont par la suite testés avec les autres paires d'amorces/sondes (pour les souches très ou

faiblement virulentes) pour confirmer la présence de virus fortement ou faiblement virulents. Les amorces et les sondes décrites ont été validées sur les souches lentogènes, mésogènes et vélogènes qui ont circulé aux États-Unis. Au pic de l'épizootie, entre 1 000 et 1 500 échantillons furent testés tous les jours par RT-PCR. Un inconvénient de la RT-PCR en temps réel est qu'actuellement des thermocycleurs spéciaux sont nécessaires ; ces appareils sont extrêmement coûteux, ce qui pourrait empêcher de nombreux laboratoires d'employer cette épreuve.

Bien que la grande majorité des souches isolées sont génétiquement apparentées, un autre problème important est que certaines souches se sont révélées génétiquement distinctes. Par exemple, certains virus qui avaient été classés dans le génogroupe 6 par Aldous *et al.* (4) puis dans la Classe I par Czegledi *et al.* (24) sont si différents des autres souches isolées, par ex. les virus de Classe II (24), que des amorces différentes sont nécessaires pour leur détection par RT-PCR.

Comme pour la détermination de la virulence, il importe que les techniques de PCR ne soient pas utilisées seules lors de résultat négatif sur des foyers suspects de MN.

2. Épreuves sérologiques

Le virus de la MN peut être utilisé comme antigène dans toute une série de tests sérologiques, ce qui permet d'utiliser la technique de neutralisation, la méthode immuno-enzymatique ELISA ou l'inhibition de l'hémagglutination (IHA) pour estimer les taux d'anticorps chez les oiseaux. C'est l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination qui est aujourd'hui la plus largement utilisée, bien que de nombreux élevages de volailles utilisent des kits ELISA commercialisés pour évaluer les anticorps après vaccination.

a) Épreuves d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination

Avec cette méthode, les sérums de poulet donnent rarement des réactions positives non spécifiques, de sorte qu'il est inutile de prétraiter les sérums. Les sérums provenant d'autres espèces que le poulet peuvent parfois provoquer une agglutination des érythrocytes de poulet. Aussi, cette réaction doit-elle être recherchée avant l'épreuve et supprimée, s'il y a lieu, par adsorption du sérum avec des érythrocytes de poulet. La technique consiste à ajouter 0,025 ml d'un culot d'érythrocytes de poulet à chaque volume de 0,5 ml d'antisérum, à agiter doucement et à laisser reposer pendant au moins 30 min. Un culot de centrifugation est alors préparé à 800 *g* pendant 2 à 5 min puis les sérums adsorbés sont mis à décanter.

Des variantes pour les méthodes utilisées pour la recherche de l'activité hémagglutinante et pour l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination existent entre les laboratoires. Les exemples recommandés ci-après correspondent à l'utilisation de plaques en matière plastique à micropuits, munies d'un fond en V, dans lesquelles le volume final pour les deux types de tests est de 0,075 ml. Les réactifs nécessaires pour ces épreuves sont du tampon PBS isotonique (0,01 M), de pH 7,0-7,2, et des érythrocytes prélevés au minimum sur trois poulets indemnes d'organismes pathogènes spécifiques, et réunis dans un volume égal de solution d'Alsever (s'il n'est pas possible de disposer de poulets indemnes d'organismes pathogènes spécifiques, le sang peut être prélevé chez des individus non vaccinés, surveillés régulièrement et non porteurs d'anticorps dirigés contre le virus de la MN). Les globules rouges doivent être lavés à trois reprises dans du tampon PBS avant d'être utilisés sous forme de suspension à 1 % (volume globulaire/volume total). Des antigènes et antisérums témoins positifs et négatifs appropriés doivent être utilisés pour chaque analyse.

• Épreuve d'hémagglutination

- i) Verser 0,025 ml de tampon PBS dans chacun des puits d'une plaque de microtitrage en matière plastique, munie d'un fond en V.
- ii) Ajouter 0,025 ml de la suspension virale (liquide allantoïque infectieux ou inactivé) dans le premier puits. Afin de déterminer avec exactitude la teneur en hémagglutinine, cette étape doit être effectuée à partir d'une fourchette étroite de dilutions initiales (1/3, 1/5, 1/7, etc. par exemple).
- iii) Des dilutions au demi de volumes de 0,025 ml de la suspension virale sont effectuées sur l'ensemble de la plaque.
- iv) Un volume supplémentaire de 0,025 ml de tampon PBS est ajouté à chaque puits.
- v) Un volume de 0,025 ml de suspension d'érythrocytes de poulet à 1 % (v/v) est ajouté à chaque puits.
- vi) La solution est mélangée en tapotant doucement la plaque. On laisse ensuite se déposer les érythrocytes pendant 40 min à température ambiante (c'est-à-dire à environ 20 °C), ou pendant 60 min à 4 °C si la température ambiante est élevée ; les érythrocytes témoins doivent alors former un bouton distinct.

- vii) La lecture de l'activité hémagglutinante est effectuée en inclinant la plaque et en recherchant la présence ou l'absence d'un flux d'érythrocytes en forme de larme. Le titre doit être lu à la dilution la plus élevée produisant une activité hémagglutinante complète (pas de flux) ; cette valeur représente 1 unité hémagglutinante et peut être calculée avec précision à partir de la fourchette initiale de dilutions.

- **Inhibition de l'hémagglutination**

- i) Verser 0,025 de tampon PBS dans chacun des puits d'une plaque de microtitrage en matière plastique, munie d'un fond en V.
- ii) Ajouter 0,025 ml de sérum dans le premier puits de la plaque.
- iii) Des dilutions au demi de volumes de 0,025 ml du sérum sont effectuées sur l'ensemble de la plaque.
- iv) 4 unités hémagglutinantes de virus ou d'antigène dans 0,025 ml sont ajoutées à chaque puits et la plaque est laissée pendant au moins 30 min à température ambiante, c'est-à-dire à environ 20 °C, ou pendant 60 min à 4 °C.
- v) On ajoute 0,025 ml de suspension d'érythrocytes de poulet à 1 % (v/v) dans chaque puits et, après avoir mélangé doucement, on laisse décanter les érythrocytes pendant 40 min à température ambiante (c'est-à-dire à environ 20 °C), ou pendant environ 60 min à 4 °C si la température ambiante est élevée ; les érythrocytes témoins doivent alors former un bouton distinct.
- vi) Le titre d'inhibition de l'hémagglutination est la dilution sérique la plus poussée qui provoque une inhibition complète de 4 unités hémagglutinantes d'antigène. L'agglutination est évaluée en inclinant les plaques. Seuls les puits dans lesquels les érythrocytes s'écoulent au même rythme que dans les puits témoins (contenant seulement 0,025 ml d'érythrocytes et 0,05 ml de PBS) doivent être considérés comme présentant une inhibition.
- vii) La validité des résultats doit être évaluée par rapport à un sérum témoin négatif, ce qui ne devrait pas donner un titre $>1/4$ ($>2^2$ ou $>\log_2 2$ en valeur inverse), et par rapport à un sérum témoin positif pour lequel le titre ne devrait pas s'écarter de plus d'une dilution du titre connu.

La valeur des épreuves sérologiques dans le diagnostic est clairement liée au statut immunitaire escompté des oiseaux touchés. Les titres d'inhibition de l'hémagglutination peuvent être considérés comme positifs si une inhibition est obtenue avec une dilution sérique de $1/16$ (2^4 ou $\log_2 4$ en valeur inverse) ou davantage en présence de 4 unités hémagglutinantes d'antigène. Certains laboratoires préfèrent utiliser 8 unités hémagglutinantes dans les tests d'inhibition de l'hémagglutination. Si cette valeur est autorisée, elle influe sur l'interprétation des résultats, de sorte qu'un titre est alors positif à partir de $1/8$ (2^3 ou $\log_2 3$). Le titrage inverse de l'antigène doit être inclus dans toutes les épreuves pour vérifier le nombre d'unités hémagglutinantes utilisées.

Les titres d'inhibition de l'hémagglutination peuvent servir à évaluer le statut immunitaire d'un élevage. Dans les élevages vaccinés soumis à une surveillance sérologique, il est possible d'identifier des réponses anamnestiques après une épreuve virulente utilisant des souches de terrain (13). Il faut toutefois rester très prudent car des variations dues à d'autres causes peuvent survenir. Il a ainsi été montré que les infections par le virus APMV-3 chez des dindons vaccinés contre la MN entraînent un accroissement substantiel des titres spécifiques du virus de la maladie (11).

b) Epreuve immuno-enzymatique

Toute une série de kits ELISA sont actuellement commercialisés. Ils reposent sur plusieurs stratégies différentes pour la détection des anticorps dirigés contre le virus de la MN, y compris les techniques indirectes, sandwich et bloquantes ou compétitives avec anticorps monoclonaux. L'un des kits au moins fait appel à un antigène sous-unitaire. Ces tests ont généralement été évalués et validés par le fabricant et il est donc essentiel que les instructions d'utilisation soient soigneusement respectées. Les épreuves d'inhibition de l'hémagglutination et les tests ELISA reconnaissent des anticorps dirigés contre différents antigènes ; selon le système utilisé, les tests ELISA peuvent détecter des anticorps dirigés contre plus d'un antigène, tandis que l'inhibition de l'hémagglutination est probablement limitée à ceux qui sont dirigés contre la protéine HN. Cependant, des études comparatives ont démontré que les tests ELISA sont reproductibles et ont une sensibilité et une spécificité élevées ; leur corrélation avec les épreuves d'inhibition de l'hémagglutination est bonne (1). Les tests ELISA conventionnels présentent l'inconvénient de nécessiter une validation du test pour chacune des espèces d'oiseaux pour lesquelles elles sont destinées. Les tests ELISA de compétition utilisent, en général, des anticorps monoclonaux qui en raison de leur spécificité pour un seul épitope, peuvent ne pas reconnaître toutes les souches d'APMV-1.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Une description détaillée de tous les aspects des vaccins préparés à partir du virus de la MN, y compris leur production et leur utilisation, a été publiée (13). Il convient de s'y référer pour obtenir des informations détaillées sur les procédures présentées ici. Des lignes directrices sur la production des vaccins vétérinaires figurent dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins vétérinaires ». Les lignes directrices fournies ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont de type général et peuvent être complétées par des spécifications nationales et régionales.

La présente section traite des vaccins vivants et inactivés classiques car ceux-ci sont toujours utilisés universellement. Il faut cependant rappeler que de nombreux travaux récents ont été consacrés à l'application des techniques de biologie moléculaire pour la production de nouveaux vaccins. Des résultats intéressants ont permis d'obtenir une protection immunitaire en utilisant le virus recombiné de la variole aviaire, le virus de la vaccine, le virus de la variole du pigeon, l'herpèsvirus du dindon et des cellules aviaires dans lesquelles sont exprimés le gène HN et/ou le gène F du virus de la MN. L'emploi de plusieurs de ces virus recombinés a été autorisé dans certains pays.

Les souches du virus de la MN utilisées dans les vaccins à virus vivants commercialisés se répartissent en deux groupes : vaccins lentogènes tels que Hitchner-B₁, La Sota, V4, NDW, I2 et F, et vaccins mésogènes tels que Roakin, Mukteswar et Komarov. Des souches appartenant à ces deux groupes ont été soumises à sélection et clonage pour remplir différents critères de production et d'application. Tous les virus vaccinaux mésogènes possèdent deux paires d'acides aminés basiques au site de clivage de F0 et des indices de pathogénicité intracérébrale de l'ordre de 1,4. Il en résulte que la contamination d'oiseaux par ces virus entrerait dans la définition de la MN (Section B.1.f) mais, comme ces vaccins sont principalement utilisés dans des pays où la maladie est enzootique, cela n'interdit pas nécessairement leur utilisation. Certains pays ont décidé que seulement des souches lentogènes de virus peuvent être utilisées pour les vaccins (42).

Les unités de production de vaccin doivent fonctionner avec les procédures et les pratiques de sécurité biologique qui conviennent. Si des virus de la MN, telle que définie dans la Section B.1.f de ce chapitre, sont utilisés pour produire des vaccins ou les contrôler par des épreuves virulentes, la partie des installations où ces opérations sont effectuées doit répondre aux exigences de niveau 4 applicables au confinement des agents pathogènes, comme indiqué dans le Chapitre 1.1.2. du présent *Manuel terrestre*.

Pour produire des vaccins à virus vivant, la multiplication du virus est généralement effectuée dans la cavité allantoïque d'œufs de poule embryonnés, mais certaines souches, et notamment des souches mésogènes, ont été adaptées à différents systèmes de culture tissulaires.

Les vaccins à virus vivants peuvent être administrés aux oiseaux par incorporation dans l'eau de boisson, sous forme de pulvérisation à grosses gouttes ou par instillation intranasale ou conjonctivale. Un vaccin à virus lentogène pour utilisation *in ovo* a été mis sur le marché aux États-Unis d'Amérique. Certaines souches mésogènes sont administrées par inoculation intradermique dans la membrane alaire. Les vaccins ont été conçus pour donner des résultats optimaux lorsqu'ils sont administrés par des voies spécifiques. En règle générale, les vaccins vivants les plus immunogènes sont les plus virulents, et par conséquent les plus susceptibles de provoquer des effets indésirables. Ainsi, la vaccination avec la souche La Sota peut donner des problèmes beaucoup plus importants chez les jeunes oiseaux sensibles que la souche Hitchner-B₁, mais la première induit une réponse immunitaire plus marquée.

Les vaccins inactivés sont nettement plus onéreux que les vaccins vivants et leur utilisation entraîne la manipulation individuelle des oiseaux pour l'injection. Ils sont préparés à partir de liquide allantoïque dont le pouvoir infectieux a été inactivé par addition de formol ou de bêta-propiolactone. Ces vaccins sont présentés en émulsion dans de l'huile minérale et administrés par voie intramusculaire ou sous-cutanée. Chaque oiseau reçoit ainsi individuellement une dose de référence. Il n'en résulte pas de propagation du virus ni de réaction respiratoire. Des souches virulentes et des souches non virulentes sont utilisées comme sémences virales, mais les souches non virulentes paraissent préférables au plan de la sécurité d'emploi. Étant donné qu'aucune multiplication du virus n'intervient après l'administration, la quantité d'antigène requise pour obtenir l'immunisation voulue est beaucoup plus importante qu'avec les vaccins à virus vivant. Il est important d'obtenir un rendement viral élevé pour produire un vaccin puissant, et la souche Ulster 2C convient très bien à cet effet.

La durée de l'immunité dépend du programme de vaccination choisi. L'une des considérations les plus importantes concernant les programmes de vaccination est le niveau d'immunité maternelle qui existe chez les jeunes poulets et qui peut varier considérablement d'une exploitation à l'autre, d'un lot à l'autre et d'un sujet à l'autre. C'est pourquoi l'on a recours à l'une des deux stratégies suivantes : les oiseaux ne sont vaccinés qu'à l'âge de 2 à 4 semaines, au moment où la plupart sont sensibles, ou bien ils sont vaccinés à l'âge d'un jour par instillation conjonctivale ou par application d'une pulvérisation à grosses gouttes. Il en résulte une infection active chez certains oiseaux, qui persistera jusqu'à la disparition de l'immunité maternelle. Une revaccination est

pratiquée 3 à 4 semaines plus tard. Il a été démontré que les vaccins inactivés peuvent également être intéressants pour vacciner les poussins d'un jour présentant un certain degré d'immunité maternelle (17). L'association d'un vaccin vivant et d'un vaccin inactivé chez les poussins d'un jour présentant une immunité maternelle a donné des résultats supérieurs à l'administration de l'un ou l'autre de ces vaccins utilisés séparément (16). La vaccination d'oiseaux d'un jour totalement sensibles, même avec le plus atténué des vaccins vivants, peut entraîner une maladie respiratoire, surtout en présence de bactéries pathogènes courantes en quantités significatives.

Seules les poules reproductrices et pondeuses sont normalement vaccinées après l'âge de 3 semaines. La vaccination doit être renouvelée à intervalles suffisamment fréquents pour maintenir une immunité adaptée. Les programmes de vaccination font souvent appel à des vaccins à virus vivants légèrement plus pathogènes pour les rappels que pour la vaccination initiale. Ces vaccins vivants plus pathogènes peuvent également être utilisés après une vaccination initiale avec des vaccins inactivés présentés sous forme d'émulsion huileuse.

La conception d'un programme de vaccination doit tenir compte du type de vaccin utilisé, du statut immunitaire et sanitaire des oiseaux à vacciner ainsi que du niveau de protection requis vis-à-vis de toute possibilité d'infection par des souches de terrain dans les conditions locales (13). Deux exemples de programmes de vaccination pouvant être utilisés dans différentes circonstances sanitaires sont détaillés ici. Dans le premier exemple, lorsque la maladie est discrète et sporadique, il est suggéré d'adopter l'ordre de vaccination suivant : Hitchner-B₁ vivant par administration conjonctivale ou en pulvérisation à l'âge d'un jour ; Hitchner-B₁ ou La Sota vivant à l'âge 18 à 21 jours, administré dans l'eau de boisson ; La Sota vivant administré dans l'eau de boisson à l'âge de 10 semaines, puis un vaccin inactivé en émulsion huileuse au moment de la ponte. Dans le second exemple, lorsque la maladie est sévère et plus répandue, le même protocole est adopté jusqu'à l'âge de 21 jours, puis il est suivi d'une revaccination à l'âge de 35 à 42 jours avec le vaccin La Sota vivant administré dans l'eau de boisson ou sous forme d'un aérosol. Cette revaccination est répétée à l'âge de 10 semaines où l'on administre un vaccin inactivé (ou un vaccin vivant mésogène) et renouvelée au moment de la ponte (13).

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

La première considération dans le choix d'une souche destinée à produire un vaccin à partir du virus vivant de la MN est son utilisation comme vaccin primaire ou secondaire, et avant tout son pouvoir pathogène. Les méthodes d'administration et la fréquence d'utilisation sont aussi des facteurs à prendre en compte. Le recours aux anticorps monoclonaux a révélé une variation considérable de l'antigénicité des différentes souches (10). Lors de la conception des vaccins, il pourrait donc s'avérer nécessaire d'accorder une plus grande attention à leur relation antigénique avec les virus prévalents sur le terrain.

Un vaccin vivant reposant sur la souche V4 du virus de la MN, sélectionné pour sa stabilité à la chaleur, a été introduit pour lutter contre les problèmes spécifiques liés aux poulets élevés en liberté dans les villages des pays en développement. Le but est d'utiliser ce vaccin pour enrober les aliments distribués à ces poulets. Les études réalisées à ce jour dans différents pays ont fourni des résultats variables, ce qui peut s'expliquer par le fait que les facteurs locaux sont extrêmement importants pour la réussite de cette stratégie (40). Plus récemment, le vaccin thermostable 12 a été développé spécifiquement pour vacciner les poulets élevés dans les villages. Il est actuellement recommandé d'administrer ce vaccin sous forme de collyre (9).

L'usage des vaccins vivants peut être restreint par la législation. Ainsi, la Décision 93/152/EEC de la Commission (21) a restreint l'usage des vaccins dans les États membres de l'Union européenne depuis le 1^{er} janvier 1995 à ceux dont la semence primaire a été contrôlée et présente un indice de pathogénicité intracérébrale < 0,4 si au moins 10⁷ doses infectantes moyennes pour l'œuf (DIO₅₀) sont administrées individuellement, ou < 0,5 si au moins 10⁸ DIO₅₀ sont administrées individuellement. De même, la Commission des normes de l'OIE considère que si les vaccins doivent en principe présenter un indice de pathogénicité intracérébrale < 0,7, une marge de sécurité doit être prévue pour tenir compte de la variabilité entre les essais et entre les laboratoires, de sorte que les souches virales utilisées pour la semence primaire ne doivent pas avoir un indice supérieur à 0,4 (35).

Le facteur essentiel pour sélectionner une semence destinée à la préparation d'un vaccin inactivé est la quantité d'antigène produite lors d'une culture sur œufs embryonnés. Il est rarement rentable de concentrer les virus. Des souches virulentes et des souches lentogènes ont été utilisées comme vaccins inactivés, mais les premières sont associées à des risques inutiles car elles impliquent la manipulation de grandes quantités de virus virulents. Elles peuvent être insuffisamment inactivées et risquent de donner lieu à des contaminations ultérieures. Ce risque est reflété par la Décision 93/152/CEE de la Commission (21) qui a restreint l'usage des virus utilisés pour la préparation des vaccins inactivés dans les États membres de l'Union européenne depuis le 1^{er} janvier 1995 à ceux dont la semence primaire présente un indice de pathogénicité intracérébrale < 0,7 si au moins 10⁸ DIO₅₀ sont administrées à chaque individu. Certaines souches lentogènes atteignent des titres très élevés dans les œufs. Des titres exceptionnellement élevés

peuvent être obtenus avec la souche Ulster 2C qui a été recommandée comme semence pour préparer des vaccins inactivés (26). Il est toutefois possible de produire avec succès des vaccins inactivés commercialisables en utilisant comme semence les souches Hitchner B₁, La Sota ou F.

Depuis les observations qui ont montré qu'un virus de la MN virulent pouvait émerger à partir de virus de faible virulence suite à des mutations (5, 39, 45), l'introduction de nouvelles souches de virus dans un vaccin vivant doit être examinée attentivement et faire l'objet au préalable d'une évaluation.

b) Méthode de culture

Après l'établissement d'une semence primaire, il convient de préparer une semence de travail. Si la souche a été clonée par dilution limite ou sélection sur plaque, la préparation d'une culture primaire peut nécessiter uniquement la production d'un gros volume de liquide allantoïque infectieux (au minimum 100 ml), qui peut être conservé sous forme de parties aliquotes lyophilisées (0,5 ml).

c) Validation du vaccin

Une semence virale d'origine inconnue doit être passée sur des œufs indemnes d'organismes pathogènes spécifiques, puis clonée avant de produire la semence primaire. Quelques passages sur des poulets indemnes d'organismes pathogènes spécifiques peuvent également être souhaitables (13). Dans tous les cas, la semence primaire doit être contrôlée après la préparation sur les plans suivants : stérilité, innocuité, activité et présence de substances étrangères. Pour les vaccins à virus vivants, certains pays exigent aussi des passages en série sur volailles afin de vérifier l'absence d'augmentation du pouvoir pathogène lors de la circulation chez les oiseaux (42).

2. Méthodes de fabrication

Pour produire le vaccin, on prépare tout d'abord une semence de travail qui permettra de produire les lots de vaccins, en portant une partie aliquote d'une semence primaire à un volume suffisant pour permettre 12 à 18 mois de production. Il est préférable de conserver la semence de travail liquide, au minimum à -60 °C, car les virus lyophilisés ne se multiplient pas toujours jusqu'à des titres élevés lors du premier passage ultérieur (13).

La plupart des vaccins contre la MN sont produits sur des œufs de poule embryonnés et les vaccins à virus vivants doivent être produits sur des œufs indemnes d'organismes pathogènes spécifiques. La méthode de production passe par la propagation aseptique à grande échelle du virus ; toutes les procédures sont effectuées dans des conditions stériles.

Il est habituel de diluer la semence de travail dans du tampon PBS stérile de pH 7,2, de sorte qu'environ 10³-10⁴ DIO₅₀/0,1 ml sont inoculées dans la cavité allantoïque d'œufs de poule embryonnés de 9 ou 10 jours, indemnes d'organismes pathogènes spécifiques. Les œufs sont alors mis à incuber à 37 °C ; ceux contenant des embryons qui meurent dans les 24 h doivent être éliminés. Le temps d'incubation dépend de la souche virale utilisée et sera prédéterminé pour assurer le rendement maximal avec le nombre minimal de morts embryonnaires.

Les œufs infectés doivent être refroidis à 4 °C avant le recueil du liquide. L'œuf est décalotté et le liquide allantoïque est aspiré après création d'une dépression où se logera l'embryon. Il faut éviter d'inclure du jaune ou de l'albumine. Tous les liquides doivent être immédiatement placés à 4 °C et la contamination bactérienne doit être recherchée avant de les regrouper en pools importants destinés à la lyophilisation ou à l'inactivation. Les vaccins vivants sont généralement lyophilisés. La méthodologie dépend de l'équipement utilisé et de l'expertise du fabricant, mais il s'agit d'une étape très importante car une lyophilisation inadéquate entraîne à la fois une chute du titre et une diminution de la durée de conservation.

Pour la fabrication des vaccins inactivés, le liquide allantoïque recueilli est traité soit au formol (concentration finale habituelle de 1/1000) ou à la bêta-propiolactone (concentration finale habituelle de 1/2000 - 1/4000). Le temps requis doit être suffisant pour garantir l'absence de virus vivants. La plupart des vaccins inactivés ne sont pas concentrés ; le liquide allantoïque inactivé est généralement émulsifié avec de l'huile minérale ou végétale. Les formulations exactes relèvent généralement de secrets de fabrication.

Les vaccins inactivés huileux sont généralement préparés sous forme d'émulsions primaires eau dans l'huile. La phase huileuse est généralement constituée de 9 volumes d'huile minérale hautement raffinée telle que Marcol 52, Drakeol 6VR et BayolF, plus un volume d'agent émulsifiant tel qu'Arlacel A, Montanide 80 et Montanide 888 (36). La phase aqueuse est le virus inactivé auquel a été ajouté un émulsifiant non ionique tel que du Tween 80. Le rapport phase huileuse/phase aqueuse est généralement compris entre 1:1 et 1:4. Les fabricants s'efforcent d'obtenir un équilibre entre l'effet adjuvant, la viscosité et la stabilité. Si la viscosité est trop élevée, le vaccin est difficile à injecter ; si elle est trop faible, le vaccin est instable.

3. Contrôles en cours de production

Il convient de tester la viabilité et l'activité de chaque lot de vaccin à virus vivant. Pour les vaccins produits sur des œufs, le contrôle le plus important en cours de fabrication est la recherche des contaminations bactériennes et fongiques. Ce contrôle est nécessaire car il arrive occasionnellement que des œufs se détériorent et ne soient pas décelés au moment du recueil du liquide.

Pour les vaccins inactivés, l'efficacité de la procédure d'inactivation doit être testée sur des œufs embryonnés, en prenant 25 parties aliquotes (0,2 ml) de chaque lot et en procédant à trois passages de chacune d'elles sur des embryons indemnes d'organismes pathogènes spécifiques (13).

4. Contrôles des lots

La plupart des pays ont publié des spécifications pour le contrôle de la fabrication et les tests des vaccins préparés à partir du virus de la MN (34) ; ces textes précisent les tests à pratiquer obligatoirement sur les vaccins pendant et après la fabrication.

Il est nécessaire de tester l'infektivité des vaccins à virus vivants pour permettre l'administration de concentrations virales adaptées. Le virus est généralement titré sur des œufs de poule embryonnés pour obtenir le DIO₅₀. Cette opération passe par la préparation de dilutions virales au 1/10^e ; 0,1 ml de chaque dilution est inoculé dans 5 à 7 œufs de poule embryonnés de 9 à 10 jours. Après incubation de 5 à 7 jours à 37 °C, les œufs sont refroidis et testés pour rechercher la présence de l'activité hémagglutinante qui est une indication de la présence du virus vivant. Le DIO₅₀ finale est calculée en utilisant une formule appropriée comme celle de Spearman-Kärber (12).

a) Stérilité

Les tests de stérilité et d'absence de contamination des matériels biologiques sont décrits au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Le recours à des poulets pour tester les vaccins implique l'inoculation à au moins 10 individus d'âge déterminé provenant d'un élevage indemne d'organismes pathogènes spécifiques. Dix doses de vaccin vivant sont administrées par voie supraconjonctivale à chaque individu, puis les poulets sont observés pendant 21 jours. Aucun sujet ne doit présenter de signes cliniques graves et aucun ne doit mourir d'une cause imputable au vaccin (22). Une autre méthode consiste à utiliser la première partie (avant épreuve) de l'épreuve réalisée pour le contrôle de l'activité comme test d'innocuité et, si des réactions indésirables apparaissent, le contrôle d'innocuité est répété. Si les résultats ne sont pas satisfaisants lors de la répétition, le lot est rejeté (42).

Pour les vaccins inactivés, on administre une dose double par la voie recommandée à 10 individus âgés de 3 semaines. Ceux-ci sont alors observés pendant 2 semaines pour vérifier l'absence de signes cliniques ou de lésions localisées.

c) Activité

Plusieurs méthodes ont été proposées pour tester l'activité des vaccins préparés à partir du virus de la MN. Certains auteurs ont souligné l'importance de l'utilisation d'une souche adaptée pour les épreuves virulentes (13). La souche Herts 33 ou GB Texas conviennent à cet effet. Pour les vaccins vivants, il convient de vacciner 10 individus ou plus indemnes d'organismes pathogènes spécifiques ou d'autres types d'oiseaux totalement sensibles, présentant l'âge minimal recommandé, en utilisant la voie d'administration indiquée par le fabricant et la dose minimale préconisée. Certains pays demandent que 20 oiseaux soient utilisés dans ce type de test (22). Au bout de 14 à 21 jours, tous les oiseaux vaccinés ainsi que 10 oiseaux témoins sont soumis à une épreuve virulente par injection intramusculaire du virus de la MN à raison de 10⁵ DL₅₀ (dose létale à 50 %). L'épreuve est considérée comme satisfaisante lorsqu'à la fin des 10 jours, 90 % des poulets vaccinés survivent sans signe de maladie et que tous les oiseaux témoins meurent dans les 6 jours.

Pour les vaccins inactivés, on utilise des poulets indemnes d'organismes pathogènes spécifiques ou des poulets sensibles, âgés de 21 à 28 jours. Trois groupes de 20 poulets reçoivent par voie intramusculaire des volumes de vaccin équivalents à 1/25^e, 1/50^e et 1/100^e d'une dose. Un groupe de 10 poulets sert de témoin. Tous les poulets sont soumis à une épreuve virulente par injection intramusculaire du virus de la MN à raison de 10⁶ DL₅₀, 17 à 21 jours plus tard. Les poulets sont observés pendant 21 jours. La dose protectrice à 50 % (DP₅₀) est calculée par des méthodes statistiques normalisées. L'épreuve n'est considérée comme satisfaisante que si tous les individus témoins meurent dans les 6 jours. Le vaccin est conforme si la DP₅₀ n'est pas inférieure à 50 par dose et si la limite de confiance inférieure est d'au moins 35 DP₅₀ par dose.

Certaines autorités de contrôle acceptent les épreuves effectuées seulement au 1/50^e par souci de protection animale.

Il n'est pas nécessaire de répéter le test d'activité sur chaque lot s'il a été montré qu'un lot représentatif du produit fini préparé à partir de la semence primaire a passé l'épreuve avec succès.

d) Durée de l'immunité

Le taux d'immunité obtenu avec chaque dose ou chaque protocole de vaccination contre la MN varie considérablement en fonction du vaccin et de l'espèce. Le taux d'immunité requis pour une espèce donnée (protection contre la mortalité, la maladie et la perte de production de viande et d'œufs) est extrêmement complexe et difficile à évaluer. En général, il convient d'évaluer la longévité des anticorps sériques ainsi que les protocoles vaccinaux adoptés pour maintenir les anticorps au-dessus d'un niveau acceptable (13).

e) Stabilité

Lorsqu'il est stocké dans les conditions recommandées, le produit vaccinal fini doit conserver son activité pendant au moins 1 an. Des tests de vieillissement accéléré provoquant une réduction de l'infectivité après incubation à 37 °C pendant 7 jours (31) peuvent être utilisés à titre indicatif pour déterminer la durée de conservation d'un lot de vaccin vivant. Les vaccins à émulsion huileuse doivent également être soumis à un vieillissement accéléré par conservation à 37 °C pendant un minimum de 1 mois, sans séparation entre les phases aqueuse et huileuse. Les États-Unis exigent que la stabilité en temps réel soit vérifiée sur les premiers lots de vaccins. Habituellement, trois échantillons sont testés pour les vaccins à virus inactivé et 10 pour les vaccins à virus vivant. Les vaccins à virus vivants doivent être utilisés immédiatement après reconstitution. Les vaccins inactivés ne doivent pas être congelés.

f) Agents de conservation

Dans la plupart des pays, aucun agent de conservation ne doit être inclus dans les vaccins vivants lyophilisés, mais des antimicrobiens peuvent être intégrés au diluant utilisé pour reconstituer le vaccin. Une autre solution, comme celle employée aux États-Unis, consiste à inclure des conservateurs mais en le mentionnant sur l'étiquette.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Les vaccins préparés à partir du virus vivant de la MN peuvent constituer un danger pour l'homme. Des infections par des virus de la MN ont été rapportées chez l'homme, s'agissant aussi bien de souches virulentes que de souches faiblement virulentes pour les poulets. La maladie s'est généralement traduite par une conjonctivite aiguë après introduction directe dans l'œil. Les infections sont en principe passagères et la cornée n'est pas atteinte.

Les vaccins présentés sous forme d'émulsion dans de l'huile minérale sont très dangereux pour la personne qui les administre. L'injection accidentelle chez l'homme doit être traitée rapidement par incision et lavage du site, comme pour une blessure par un pistolet à graisse.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir la Section C.4.b ci-dessus.

b) Activité

Voir la Section C.4.c ci-dessus.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ADAIR B.M., McNULTY M.S., TODD D., CONNOR T.J. & BURNS K. (1989). Quantitative estimation of Newcastle disease virus antibody levels in chickens and turkeys by ELISA. *Avian Pathol.*, **18**, 175–192.
2. ALDOUS E.W. & ALEXANDER D.J. (2001). Technical Review: Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1) *Avian Pathol.*, **30**, 117–128.
3. ALDOUS E.W., COLLINS M.S., MCGOLDRICK A. & ALEXANDER D.J. (2001). Rapid pathotyping of Newcastle disease virus (NDV) using fluorogenic probes in a PCR assay. *Vet. Microbiol.*, **80**, 201–212.

4. ALDOUS E.W., MYNN J.K. BANKS J. & ALEXANDER D.J. (2003). A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol.*, **32**, 239–357.
5. ALEXANDER D.J. (2001). Newcastle disease – The Gordon Memorial Lecture. *Br. Poult. Sci.*, **42**, 5–22.
6. ALEXANDER D.J. (2003) Newcastle disease, other avian Paramyxoviruses and pneumovirus infections: Newcastle disease. *In: Diseases of Poultry*, Saif Y.M., ed. Iowa State University Press, USA, 64–87.
7. ALEXANDER D.J. & ALLAN W.H. (1974). Newcastle disease virus pathotypes. *Avian Pathol.*, **3**, 269–278.
8. ALEXANDER D.J., BANKS J., COLLINS M.S., MANVELL R.J., FROST K.M., SPEIDEL E.C. & ALDOUS E.W. (1999). Antigenic and genetic characterisation of Newcastle disease viruses isolated from outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. *Vet. Rec.*, **145**, 417–421.
9. ALEXANDER D.J., BELL J.G. & ALDERS R.G. (2004). A Technology Review: Newcastle disease – With special emphasis on its effects on village chickens. FAO Animal Production and Health Paper 161. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, Italy.
http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/006/y5162e/y5162e00.htm
10. ALEXANDER D.J., MANVELL R.J., LOWINGS J.P., FROST K.M., COLLINS M.S., RUSSELL P.H. & SMITH J.E. (1997). Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathol.*, **26**, 399–418.
11. ALEXANDER D.J., PATTISON M. & MACPHERSON I. (1983). Avian paramyxovirus of PMV-3 serotype in British turkeys. *Avian Pathol.*, **12**, 469–482.
12. ALLAN W.H. & HEBERT C.N. (1968). The precision of virus endpoint determinations. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **25**, 330–336.
13. ALLAN W.H., LANCASTER J.E. & TOTH B. (1978). Newcastle Disease Vaccines. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
14. BARBEZANGE C. & JESTIN V. (2002). Development of a RT-nested PCR test detecting pigeon Paramyxovirus-1 directly from organs of infected animals. *J. Virol. Methods*, **106**, 197–207.
15. BEARD C.W. & HANSON R.P. (1981). Newcastle disease. *In: Diseases of Poultry*, Eighth Edition, Hofstad M.S., Barnes H.J., Calnek B.W., Reid W.M. & Yoder H.W., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 452–470.
16. BENNEJEAN G., GUITTET M., PICAULT J.P., BOUQUET J.F., DEVAUX B., GAUDRY D. & MOREAU Y. (1978). Vaccination of day-old chicks against Newcastle disease using inactivated oil adjuvant vaccine and/or live vaccine. *Avian Pathol.*, **7**, 15–27.
17. BOX P.G., FURMINGER G.S., ROBERTSON W.W. & WARDEN D. (1976). The effect of Mareks disease vaccination on the immunisation of day-old chicks against Newcastle disease using B1 and oil emulsion vaccine. *Avian Pathol.*, **5**, 299–306.
18. CHANG P.W. (1981). Newcastle disease. *In: CRC Handbook Series in Zoonoses. Section B: Viral Zoonoses Volume II*, Beran G.W., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 261–274.
19. COLLINS M.S., FRANKLIN S., STRONG I, MEULEMANS G. & ALEXANDER D.J. (1998). Antigenic and phylogenetic studies on a variant Newcastle disease virus using anti-fusion protein monoclonal antibodies and partial sequencing of the fusion protein gene. *Avian Pathol.*, **27**, 90–96.
20. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (1992). Council directive 92/66/EEC of 14 July 1992 introducing Community measures for the control of Newcastle disease. *Off. J. European Communities*, **L260**, 1–20.
21. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (1993). Commission Decision of 8 February 1993 laying down the criteria for vaccines to be used against Newcastle disease in the context of routine vaccination programmes. *Off. J. European Communities*, **L59**, 35.
22. COUNCIL OF EUROPE (1997). European Pharmacopoeia, Third Edition. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France.
23. CREELAN J.L., GRAHAM D.A. & MCCULLOUGH S.J. (2002). Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathol.*, **31**, 493–499.
24. CZEGLEDI A., UJVARI D., SOMOGYI E., WEHMANN E., WERNER O. & LOMNICZI B. (2006). Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus and evolutionary implications. *Virus Res.*, **120**, 36–48.

25. GOHM D.S., THUR B. & HOFMANN M.A. (2000). Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. *Avian Pathol.*, **29**, 143–152.
26. GOUGH R.E., ALLAN W.H. & NEDELCIU D. (1977). Immune response to monovalent and bivalent Newcastle disease and infectious bronchitis inactivated vaccines. *Avian Pathol.*, **6**, 131–142.
27. HANSON R.P. (1980). Newcastle disease. *In*: Isolation and Identification of Avian Pathogens, Hitchner SB., Purchase HG. & Williams J.E., eds. AAAP, College Station, Texas, USA, 63–66.
28. HERCZEG J., WEHMANN E., BRAGG R.R., TRAVASSOS DIAS P.M., HADJIEV G., WERNER O. & LOMNICZI B. (1999). Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in South Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe. *Arch. Virol.*, **144**, 2087–2099.
29. JESTIN V. & JESTIN A. (1991). Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by *in vitro* enzymatic amplification (PCR). *Arch. Virol.*, **118**, 151–161.
30. KOCH G. (2003) Laboratory issues: Assessment of the sensitivity and specificity of PCR for NDV on cloacal and tracheal swabs compared to virus isolation. Proceedings of the Joint Seventh Annual Meetings of the National Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union, Padova, Italy, 2002, 114–117.
31. LENSING H.H. (1974). Newcastle disease – live vaccine testing. *Dev. Biol. Stand.*, **25**, 189–194.
32. LOMNICZI B., WEHMANN E., HERCZEG J., BALLAGI-PORDANY A., KALETA E.F., WERNER O., MEULEMANS G., JORGENSEN P.H., MANTE A.P., GIELKENS A.L.J., CAPUA I. & DAMOSER J. (1998). Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch. Virol.*, **143**, 49–64.
33. MASE M., IMAI K., SANADA Y., SANADA N., YUASA N., IMADA T., TSUKAMOTO K & YAMAGUCHI S. (2002). Phylogenetic analysis of Newcastle disease virus genotypes isolated in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3826–3830.
34. MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (1993). Specifications for the Production and Control of Avian Live Virus Vaccines. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
35. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (2000). Report of the meeting of the OIE Standards Commission, November 2000. OIE, Paris, France, p. 4.
36. PALYA V. & RWEYEMAMU M.M. (1992). Live versus inactivated Newcastle disease vaccines. Proceedings of the FAO Symposium Newcastle Disease Vaccines for Rural Africa, Debre Zeit, Ethiopia, April 1991, 107–119.
37. PARK N.-Y., CHOI H.-I., CHO H.-S., KANG S.-K., CHO K.-O. & BROWN C. (2002). Development of diagnostic techniques for Newcastle disease in chickens by *in situ* RT-PCR and *in situ* hybridization. *Korean J. Vet. Res.*, **42**, 351–362.
38. SEAL B., KING D.J. & BENNETT J.D. (1995). Characterisation of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2624–2630.
39. SHENGQING Y., KISHIDA N., ITO H., KIDA H., OTSUKI K., KAWAOKA Y. & ITO T. (2002). Generation of velogenic Newcastle disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens. *Virology*, **301**, 206–211.
40. SPRADBROW P.B., ED. (1992). Newcastle Disease in Village Chickens. Proceedings No. 39, Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia, 189 pp.
41. TAKAKUWA H., ITO T., TAKADA A., OKAZAKI K. & KIDA H. (1998). Potentially virulent Newcastle disease viruses are maintained in migratory waterfowl populations. *Jpn J. Vet. Res.*, **45**, 207–215.
42. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2000). Code of Federal Regulations, Title 9, Parts 1–199. US Government Printing Office, Washington DC, USA.
42. WEHMANN E., CZEGLIEDI A., WERNER O., KALETA E.F. & LOMNICZI B. (2003). Occurrence of genotypes IV, V, VI and VIIa in Newcastle disease outbreaks in Germany between 1939 and 1995. *Avian Pathol.*, **32**, 157–163.

44. WEINGARTL H.M., RIVA J. & KUMTHEKAR P. (2003). Molecular characterisation of avian paramyxovirus 1 isolates collected from cormorants in Canada from 1995 to 2000. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1280–1284.
45. WESTBURY H. (2001). Commentary. Newcastle disease virus: an evolving pathogen. *Avian Pathol.*, **30**, 5–11.
46. WISE M.G., SUAREZ D.L., SEAL B.S., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., KING D.J., KAPCZYNSKI D. & SPACKMAN E. (2004). Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 329–338.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la maladie de Newcastle (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site Internet de l'OIE pour obtenir une liste actualisée www.oie.int).

RHINOTRACHÉITE INFECTIEUSE DE LA DINDE (metapneumovirus aviaires)

RÉSUMÉ

Les metapneumovirus aviaires (aMPV) sont responsables d'une infection aiguë et hautement contagieuse de l'appareil respiratoire supérieur, essentiellement chez la dinde et le poulet. La maladie provoquée par les aMPV a dans le passé été dénommée « pneumovirose aviaire » et « rhinotrachéite aviaire », elle a aussi été qualifiée de « Rhinotrachéite infectieuse » chez la dinde et de « Syndrome Infectieux de la Grosse Tête » chez le poulet. Les metapneumovirus aviaires sont dotés d'un génome constitué d'ARN simple brin, non segmenté et de polarité négative, appartenant à la famille des Paramyxoviridae et au genre Metapneumovirus. La maladie peut provoquer des pertes économiques importantes chez la dinde et le poulet, tout particulièrement quand elle est aggravée par des surinfections. Les seules autres espèces aviaires connues comme sensibles à l'infection par les aMPV, en dehors de la dinde et du poulet, sont le faisan, le canard de Barbarie et la pintade. La maladie a une distribution mondiale dans les régions productrices de volaille et seuls l'Océanie et le Canada ont rapporté être indemnes d'infections par les aMPV. Quatre sous types antigéniques (A, B, C et D) d'aMPV ont été définis par neutralisation à l'aide d'anticorps monoclonaux ou par l'analyse de la séquence de leur protéine d'attachement (notée G).

Chez les dindes sensibles, l'infection respiratoire peut survenir à tout âge, bien que les jeunes sujets apparaissent plus sévèrement affectés. La gravité de la maladie et le taux de mortalité dépendent fortement des infections bactériennes secondaires. L'infection par les aMPV peut provoquer des problèmes de ponte importants dans les élevages de dindes reproductrices. Les signes cliniques comprennent des éternuements, des râles trachéaux, des écoulements nasaux et oculaires ainsi qu'un gonflement des sinus infra orbitaires et une conjonctivite. Les signes cliniques et la diffusion de la maladie au sein d'un élevage peuvent être subits et survenir en l'espace de seulement 2 à 4 heures. Chez le poulet, la maladie est caractérisée par de l'apathie et un œdème de tête et des sinus infra orbitaires, conduisant à des troubles respiratoires discrets, des problèmes de production d'œuf et au Syndrome Infectieux de la Grosse Tête (SIGT). Des troubles de l'équilibre, du torticolis et de l'opisthotonos suivent fréquemment. Chez le poulet de chair, l'aMPV n'est pas pathogène seul, mais participe avec d'autres agents à l'étiologie du SIGT ou d'autres syndromes respiratoires.

Identification de l'agent pathogène : *l'isolement viral sur cultures cellulaires, sur œufs embryonnés et sur cultures d'anneaux de trachée, comme différentes méthodes moléculaires d'identification des acides nucléiques, ont tous été utilisés avec succès pour détecter les aMPV, mais le degré de réussite dépend de la souche virale, du sous-type et d'une récolte précoce des prélèvements, tout autant que des conditions de stockage ou de manipulation de ces derniers. La microscopie électronique, la neutralisation virale et les techniques moléculaires sont largement utilisées pour identifier le virus. La détection et l'identification virale peuvent être difficiles et exigent des prélèvements récoltés précocement au cours de la maladie. Les souches atténuées comme les souches virulentes d'aMPV se répliquent avec les titres viraux les plus élevés au niveau des tissus de l'appareil respiratoire supérieur des jeunes dindes, mais pendant seulement 10 jours.*

Des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine G ont été utilisés dans des épreuves de neutralisation virale pour différencier les sous types A et B, alors que les tests de neutralisation basés sur des sérums polyclonaux ont montré que les sous-types A et B appartiennent à un unique sérotype. Les virus de sous-type C ne sont que faiblement neutralisés par les sérums monospécifiques, et pas du tout par les anticorps monoclonaux, qui différencient les sous-types A et B. Ces données suggèrent que le sous type C représente un second sérotype d'aMPV. Des

sérums monospécifiques et des anticorps monoclonaux peuvent être utilisés pour l'identification de l'agent viral par neutralisation ou coloration immunofluorescente de cultures cellulaires infectées, mais les caractéristiques antigéniques du virus doivent être prises en compte. Le test d'immunodiffusion en milieu gélosé a également été utilisé pour confirmer l'identité d'isolats d'aMPV.

Des méthodes moléculaires basées sur les gènes F, G, M et N des aMPV ont été utilisées pour la détection et ou le sous-typage génomique des aMPV. Les protéines codées par les gènes F et G sont les principaux immunogènes et en tant que tels, présentent une variabilité nucléotidique. L'analyse des séquences nucléiques du gène G a été utilisée pour confirmer les études de neutralisation virale antérieures différenciant les sous-types A et B. Des procédures conventionnelles de transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) peuvent aussi être utilisées pour le sous-typage génomique des aMPV A et B. De plus, l'analyse de la séquence nucléotidique du gène codant la protéine de matrice (M) confirme la répartition des aMPV en sous-types A et B. L'analyse de la séquence nucléotidique du gène M des aMPV de sous-type C montre que l'isolat provenant des États-Unis d'Amérique est distinct des virus des sous-types A et B. Des épreuves de RT-PCR ciblant les gènes F et M et peuvent être utilisées pour la détection des aMPV lorsque la nature du sous-type de virus recherché est connue. Toutefois, il a été démontré qu'un jeu unique d'amorces de RT-PCR ciblant le gène N détectent les deux sous-types A et B et pourraient sans doute être utilisés comme amorces universelles pour la détection des aMPV.

Épreuves sérologiques : l'isolement et l'identification des aMPV étant difficiles, l'infection est souvent confirmée par des méthodes sérologiques, tout particulièrement dans les bandes non vaccinées. La méthode la plus couramment utilisée est l'épreuve d'immunoabsorption à enzyme conjuguée (ELISA). Les autres méthodes qui ont été utilisées sont la neutralisation virale (VN), l'immunofluorescence et l'immunodiffusion en milieu gélosé. La VN peut être réalisée sur cultures d'anneaux de trachée, de fibroblastes d'embryon de poulets, d'hépatocytes d'embryon de poulet ou de cellules Vero. Toutefois, la VN et l'ELISA ont une sensibilité comparable et l'ELISA est l'épreuve la plus couramment utilisée. De nombreux kits ELISA commerciaux ou développés par les laboratoires pour leur propre usage sont disponibles. Des différences de sensibilité et de spécificité ont été décrites entre kits commerciaux. Une souche homologue d'aMPV devrait être utilisée comme antigène à cause des variations d'antigénicité. Dans plusieurs pays où la maladie est enzootique, la vaccination est mise en œuvre ce qui complique l'interprétation des résultats sérologiques. Idéalement, des échantillons sériques prélevés lors de la phase aiguë de la maladie et des échantillons d'animaux convalescents devraient être inclus dans l'analyse. Dans l'espèce poule, les réponses sérologiques à l'infection par les aMPV sont faibles, par comparaison avec ce qui est observé chez la dinde.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : cette partie du texte est à l'étude, l'information concernant les vaccins devrait être ajoutée à la version en ligne du Manuel Terrestre dès son approbation par le Comité International de l'OIE.

A. INTRODUCTION

Les metapneumovirus aviaires (aMPV) – précédemment dénommés pneumovirus aviaires (APV) et virus de la rhinotrachéite aviaire (ART) – sont responsables d'une infection aiguë et hautement contagieuse du tractus respiratoire supérieur chez la dinde et le poulet. Chez la dinde, le virus provoque une maladie connue en tant que rhinotrachéite infectieuse (RTI) de la dinde. L'agent étiologique est un virus dont le génome non segmenté est constitué d'ARN simple brin et de polarité négative, a une longueur d'environ 15 kilobases et présente une symétrie hélicoïdale (17). Le virus est caractérisé comme un pneumovirus, mais il diffère des pneumovirus des mammifères au niveau moléculaire et il a été récemment classé comme l'espèce type d'un nouveau genre viral, *Metapneumovirus*, au sein de la famille des *Paramyxoviridae* (35). Des données récentes indiquent que des virus comparables ont été détectés chez l'homme, chez lequel ils sont associés à des infections respiratoires chez l'enfant (30, 48). Les metapneumovirus aviaires ne possèdent pas de protéines non structurales NS1 et NS2 et l'ordre de leurs gènes (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') est différent de celui des metapneumovirus des mammifères (3'-NS1-NS2- N-P-M-SH-G-F-M2-L-5') (46). Les aMPV ont été classés en quatre sous-types, A, B, C et D, sur la base de l'analyse de leurs séquences nucléotidiques et des essais de neutralisation avec des anticorps monoclonaux (8, 14). D'autres sous-types pourraient exister mais n'ont pas encore été détectés ni identifiés.

L'infection par les aMPV peut survenir à partir du très jeune âge chez la dinde et se caractérise par des claquements de la langue, des râles, des étternuements, un jetage nasal, une conjonctivite mousseuse, le gonflement des sinus infra-orbitaires et un œdème sous-mandibulaire (37). Des agents de surinfection peuvent aggraver de façon dramatique les signes cliniques. En l'absence de surinfection, la guérison est rapide et les oiseaux retrouvent une apparence normale en environ 14 jours. Lorsque les conditions d'élevage sont dégradées ou que survient une surinfection bactérienne, aérosacculite, péricardite, pneumonie et périhépatite peuvent venir augmenter les taux de morbidité et de mortalité (12, 28). Les agents de surinfection qui ont été décrits comme aggravant et prolongeant la maladie sont *Bordetella avium*, des bactéries apparentées aux pasteurelles, *Mycoplasma gallisepticum*, *Ornithobacterium rhinotracheale* et *Escherichia coli* (1, 12, 21, 41). La morbidité peut atteindre 100 %, avec une mortalité variant de 0,5 % chez la dinde adulte à 80 % chez le jeune dindonneau (5, 17, 51). Les signes cliniques accompagnant l'infection chez le poulet sont moins caractéristiques que ceux observés chez la dinde. Une détresse respiratoire importante peut survenir chez le poulet de chair, en particulier en cas d'aggravation par des agents pathogènes secondaires tels que le virus de la bronchite infectieuse aviaire, les mycoplasmes et *Escherichia coli* (33, 34). À la différence des virus de sous-types A et B, la souche virale présente aux États-Unis d'Amérique (sous-type C) n'a pas été décrite comme provoquant naturellement une maladie chez le poulet, ceci bien qu'il ait été démontré expérimentalement que des poulets étaient sensibles à un aMPV de sous-type C isolé chez la dinde (43). Il a été démontré que différentes souches d'aMPV présentent un tropisme plus spécifique pour le poulet ou la dinde (15). Bien qu'il y ait des preuves de l'infection d'autres espèces aviaires par les aMPV, des signes cliniques ont rarement été décrits (18). Des virus semblables aux aMPV de sous-type C ont été décrits chez le canard en France en association avec des signes respiratoires et des troubles de la ponte (47). L'analyse moléculaire rétrospective de virus collectés au cours des années 1980 chez la dinde en France a révélé la présence d'un quatrième sous-type d'aMPV désigné sous-type D (3). Les résultats des études expérimentales suggèrent qu'un contact direct est nécessaire pour la diffusion d'oiseau à oiseau du virus (1, 12). Dans les conditions de terrain, la transmission a probablement lieu aussi par voie aérienne, du fait que la maladie est limitée au tractus respiratoire. Après l'infection expérimentale de dindes âgées de deux semaines, le virus n'a été détecté que pendant quelques jours au niveau du tractus respiratoire (2) chez les oiseaux qui avaient reçu un aMPV seul. Cependant, chez les oiseaux inoculés avec un aMPV et *B. avium* le virus était détecté jusqu'à 7 jours après inoculation (7). Il n'y a pas d'élément suggérant que les aMPV puissent induire des infections latentes et aucun portage n'est décrit. Bien que des dindes nouvellement écloses soient à l'occasion infectées (42), aucune transmission verticale des aMPV n'a été décrite.

Chez la dinde en croissance la réplication virale est de courte durée et limitée au tractus respiratoire supérieure. La réplication des souches atténuées ou virulentes d'aMPV persiste jusqu'à environ 10 jours après l'infection (12, 51). Une faible réplication survient dans la trachée et les poumons, mais la réplication virale n'a pas été mise en évidence dans les autres tissus après infection naturelle (9, 10). Des études histologiques et immunocytochimiques séquentielles ont mis en évidence la réplication virale au niveau des cornets nasaux, ce qui cause à 2 jours après l'infection une rhinite séreuse avec augmentation de l'activité glandulaire, exfoliation épithéliale, perte focale des cils de la muqueuse respiratoire, hyperémie et une légère infiltration de la sous-muqueuse par des cellules mononuclées. Trois à quatre jours après l'infection, une rhinite catarrhale avec exsudat muco-purulent, des lésions de la couche épithéliale et un abondant infiltrat inflammatoire à cellules mononuclées étaient apparents. Des lésions transitoires étaient visibles dans la trachée avec peu ou pas de lésions dans la conjonctive et les autres tissus (24). L'infection respiratoire est moins grave chez les dindes reproductrices, mis il peut y avoir une chute de ponte allant jusqu'à 70 % (45) et la qualité des œufs durant la période de convalescence, jusqu'à 3 semaines, peut être dégradée.

Chez le poulet il y a des éléments probants suggérant que l'aMPV est l'un des agents étiologiques du syndrome infectieux de la grosse tête (SIGT). Le syndrome est caractérisé par une maladie respiratoire, de la prostration, un gonflement des sinus infra orbitaires et un œdème facial uni ou bilatéral pouvant s'étendre à toute la tête. Ces symptômes sont fréquemment suivis de troubles de l'équilibre d'origine centrale, de torticolis et d'opisthotonos. Bien que la mortalité n'excède habituellement pas 1 à 2 %, la morbidité peut atteindre 10 % et la ponte est fréquemment affectée (19, 29, 33, 34, 46).

Les données sérologiques suggèrent que les aMPV sont largement répandus dans le monde et ont une importance économique considérable, particulièrement chez la dinde. L'Océanie et le Canada sont les seules régions qui n'ont pas rapporté la présence d'aMPV (9, 10, 17). Des données sérologiques et moléculaires montrent que les aMPV sont présents chez des espèces aviaires variées, incluant le faisan, la pintade, l'autruche, les passereaux et différentes espèces d'oiseaux aquatiques (4, 17, 44), mais il n'y a pas de preuve d'une maladie grave associée chez ces espèces.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Afin d'optimiser les chances d'isolement viral, il est recommandé de mettre en œuvre de multiples approches diagnostiques. Ceci est tout particulièrement important lorsqu'on a affaire à différents sous-types ou génotypes viraux qui peuvent rendre nécessaire la mise en œuvre de techniques *in vitro* différentes pour l'isolement viral. Cette situation a été illustrée aux États-Unis d'Amérique avec l'échec des essais de culture sur anneaux de trachée de l'aMPV C, qui n'est pas associé à la ciliostase (13, 41). L'agent a été cultivé après plusieurs passages sur œufs embryonnés et cultures cellulaires. Cette situation contraste avec l'expérience en Europe et dans les autres pays, dans lesquels les anneaux de trachée s'étaient révélés être la méthode la plus fiable pour l'isolement primaire des aMPV A et B (11).

- **Récolte et sélection des prélèvements diagnostiques**

Il est très important de collecter les échantillons destinés aux essais d'isolement au cours des phases précoces de l'infection, car le virus peut n'être présent que peu de temps au niveau des sinus et des cornets nasaux. Idéalement, un écouvillon stérile devrait être utilisé pour écouvillonner le tractus respiratoire supérieur d'animaux vivants en phase clinique aiguë (17, 45). Les échantillons les plus efficaces se sont révélés l'exsudat nasal, des écouvillons de la fente palatine ainsi que des grattages des tissus sinusaux et des cornets nasaux. Le virus a aussi été isolé de la trachée et des poumons ainsi que rarement à partir des viscères des dindonneaux malades (5, 13). L'isolement viral est rarement couronné de succès à partir des oiseaux présentant des symptômes graves de maladie chronique, car ces symptômes sont généralement provoqués par les agents de surinfection. Ceci s'applique tout particulièrement au SIGT du poulet, dans lequel les symptômes caractéristiques apparaissent dus à une surinfection par *Escherichia coli*. De plus, pour des raisons mal expliquées, l'isolement viral semble plus difficile chez le poulet que chez la dinde.

Il est essentiel que les échantillons qui nécessitent un transport jusqu'au laboratoire de diagnostic soient expédiés immédiatement sous régime du froid. Si un délai de transport supérieur à 3 jours est à prévoir, les échantillons doivent être congelés avant expédition. Les écouvillons destinés à l'isolement viral doivent être expédiés au contact de la glace, complètement immergés dans un milieu de transport viral, mais ceux destinés à la RT-PCR peuvent être expédiés secs.

Pour l'isolement viral, une suspension à 20% (v/v) d'exsudat nasal ou d'homogénat tissulaire est préparée dans du tampon phosphate (PBS) ou du bouillon cœur-cerveau (BHI) contenant des antibiotiques, à pH 7,0-7,4. Cette suspension est clarifiée par centrifugation à 1 000 g pendant 10 min et le surnageant est filtré sur membrane de porosité 450 nm.

- **Culture et Identification des metapneumovirus aviaires (aMPV)**

La meilleure méthode pour l'isolement viral primaire à partir d'oiseaux infectés est l'isolement sur culture d'anneaux de trachée ou sur œuf embryonné de dinde ou de poule, suivi par une propagation en culture cellulaire (5, 13). Le premier isolement d'aMPV en Afrique du Sud à la fin des années 1970 et l'isolement plus récent de la souche Colorado d'aMPV ont été réalisés sur œufs embryonnés, mais les isollements des aMPV de sous-types A et B ont couramment été réalisées sur anneaux de trachée (11). Le sous-type C d'aMPV, comme peut-être d'autres aMPV non encore identifiés, ne provoque pas de ciliostase sur culture d'anneaux de trachée, raison pour laquelle l'œuf embryonné puis la propagation en culture cellulaires sont les méthodes privilégiées pour l'isolement primaire (17, 41).

Les cultures d'anneaux de trachée sont préparées à partir d'embryons de dinde ou de très jeunes dindes provenant de troupeaux de reproductrices dépourvues d'anticorps dirigés contre les aMPV. Les trachées d'embryon de poulet ou de poussins âgés d'un ou deux jours peuvent également être utilisées. Les coupes transversales de la trachée sont rincées dans du PBS (pH = 7,2) puis distribuées une coupe par tube dans du milieu de Eagle avec des antibiotiques avant d'être maintenues à 37 °C. Pour l'inoculation avec le matériel infectieux, les tubes sont asséchés et 0,1 ml d'inoculum exempt de contaminants bactériens sont ajoutés. Après incubation pendant 1 h à 37 °C, le milieu de culture est ajouté et les cultures sont incubées à 37 °C sur un agitateur orbital tournant à 30 révolutions par heure. Les cultures sont examinées quotidiennement après agitation sur un agitateur pour éliminer les débris de la lumière de l'anneau. La ciliostase peut se manifester au premier passage dans les 7 jours qui suivent l'inoculation mais n'est habituellement produite rapidement et de façon répétable qu'après plusieurs passages aveugles (17).

Des œufs de poule ou de dinde embryonnés de 6 à 8 jours provenant de troupeaux de reproductrices dépourvues d'anticorps dirigés contre les aMPV sont inoculés par voie intra-vitelline avec 0,2 à 0,3 ml d'un inoculum exempt de contaminants bactériens et provenant des sujets infectés, puis les œufs sont incubés à 37 °C. Le sac vitellin doit être utilisé pour un second passage en aveugle sur œuf embryonné s'il n'y a pas de signes d'infection (nanisme des embryons ou mortalité embryonnaire) au premier passage. En 7 à 10 jours, il apparaît habituellement du nanisme et quelques embryons morts. Un passage en série est

souvent nécessaire avant que le virus ne cause une mortalité embryonnaire répétable. L'isolement sur œuf embryonné est lent, coûteux, exigeant en main d'œuvre et nécessite d'être suivi de multiples passages sur culture cellulaire pour l'identification virale (17).

Différents types de cultures cellulaires ont été utilisés avec un succès variable pour l'isolement primaire des aMPV, tels que les cellules d'embryon de poulet, les cellules Vero et, plus récemment, les cellules QT-35. L'isolement primaire du sous-type C a été réalisé après passage multiple (5-6 passages en série) sur cellules Vero (4). Toutefois, une fois que le virus a été adapté à la réplication sur œuf embryonné ou sur cultures d'anneaux de trachée, dans lesquels il se propage seulement à bas titre, le virus se répliquera rapidement et avec des titres modérés après plusieurs passages sur différentes cultures primaires d'embryon de poulet ou de dinde, sur cellules Vero ou sur cellules QT-35 (5, 9, 10, 20, 38). Le virus produit dans les 7 jours suivants l'inoculation un effet cytopathogène (ECP) caractéristique, avec formation de syncytiums en cellules QT-35 et en fibroblastes d'embryon de poulet. L'identification des virus dans les cultures cellulaires infectées peut être réalisée par coloration de celles-ci en immunofluorescence ou par une épreuve de neutralisation virale avec réduction de plaques sur culture de cellules QT-35 (39, 40).

En microscopie électronique à transmission après coloration négative, le virus présente une morphologie comparable à celle des autres paramyxovirus. Des particules pléomorphes, frangées, grossièrement sphériques et d'un diamètre de 80 à 200 nm sont fréquemment observées. Plus rarement, des formes filamenteuses beaucoup plus longues sont présentes, elles peuvent atteindre une longueur de 1000 nm. Les projections membranaires sont longues de 13 à 14 nm et la nucléocapside hélicoïdale, qui peut parfois être observée s'échappant des particules virales déchirées, a un diamètre de 14 nm pour un pas de 7 nm par tour (7).

• Identification moléculaire

Du fait du caractère laborieux des méthodes d'isolement viral applicables aux aMPV (11, 17), la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) représente une méthode significativement plus sensible et rapide pour la détection des aMPV. Des techniques de RT-PCR ciblant les gènes F, M, N et G sont utilisées pour la détection des aMPV. Toutefois, du fait des variations de séquence nucléotidique entre les souches d'aMPV, la plupart des techniques de RT-PCR soit sont spécifiques d'un sous-type donné, soit ne détectent pas tous les sous-types viraux (2, 11, 35, 36). Des épreuves spécifiques d'un sous-type peuvent être utilisées pour la détection de souches virales endémiques (3, 11, 26, 31, 36). En revanche, les limites de ces épreuves doivent être prises en compte lorsqu'on les met en œuvre pour le diagnostic étiologique d'une maladie respiratoire. Il a été démontré que des amorces nucléotidiques s'hybridant dans des zones conservées du gène N ont une spécificité plus large et détectent des virus représentatifs des sous-types A, B, C et D (3). Des épreuves de RT-PCR ciblant le gène G ont aussi été utilisées avec succès pour l'identification du génotype ou du sous-type (22, 23, 25). Des techniques de RT-PCR variées ont été développées et évaluées, elles ont fait l'objet de nombreuses publications qui peuvent être consultées (11, 32).

L'exsudat nasal, les écouvillonnages de la fente palatine et les échantillons de cornets nasaux récoltés 2 à 7 jours après la date d'infection sont les échantillons à privilégier (15, 17, 36, 45). Il est impératif de récolter les prélèvements lorsque les symptômes viennent d'apparaître, dans la mesure où de récentes études ont montré que les quantités maximales de virus dans la trachée et les cornets nasaux étaient présentes au troisième jour après inoculation et que l'ARN viral persistait 9 jours dans la trachée et 14 jours dans les cornets nasaux (49). Il a été démontré que les aMPV peuvent être détectés dans des prélèvements collectés 7 à 10 jours après infection, toutefois la concentration virale est considérablement diminuée, ce qui réduit les chances de détection (1, 36). Les écouvillons récoltés au sein d'un même élevage peuvent être poolés par cinq pour augmenter le taux de détection.

L'ARN matrice pour le test de RT-PCR peut être extrait à partir d'un homogénat tissulaire, d'écouvillons secs ou de pools d'écouvillons humides, avec des colonnes de silice ou des billes magnétiques et des réactifs commerciaux d'extraction, selon les recommandations des fabricants. Les surnageants d'écouvillons trachéaux ou de fluide sinusal (140 µl/600 µl de tampon de lyse) peuvent également être traités selon le protocole d'extraction RNeasy® (Qiagen, Valencia, CA, USA).

Cible	Nom de l'amorce	Séquence 5'–3'	Position	Taille de l'amplicon
Gène N	Nc	5'–TTC-TTT-GAA-TTG-TTT-GAG-AAG-A–3'	632–653	Amorce RT
	Nx	5'–CAT-GGC-CCA-ACA-TTA-TGT-T–3'	830–812	115
	Nd	5'–AGC-AGG-ATG-GAG-AGC-CTC-TTT-G–3'	716–737	115

- i) La synthèse de l'ADNc peut être réalisée sous un volume de 20 µl avec l'amorce de RT 'Nc' et l'enzyme SuperScript II® Rnase H-RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) enzyme. Chauffer à 65 °C pendant 5 min un mélange constitué de 1 µl d'amorce pour la RT (2 pmol), 1 µl de mélange de dNTP (chacun à 10 mM), avec l'ARN extrait et de l'eau distillée stérile (qsp 20 µl).
- ii) Refroidir rapidement et centrifuger brièvement.
- iii) Ajouter 4 µl de tampon « First-Strand buffer » × 5, 2 µl de DTT 0,1 M et 1 µl d'inhibiteur d'ARNase RNaseOUT® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- iv) Chauffer à 42 °C pendant 2 min et ajouter 1 µl (200 unités) d'enzyme SuperScript II®, mélanger doucement.
- v) La RT est conduite à 42 °C pendant 50 min, puis à 70 °C pendant 15 min pour l'inactivation de l'enzyme RT.
- vi) L'amplification en chaîne par polymérase (PCR) peut être réalisée avec l'enzyme AmpliTaq Gold® polymérase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), selon les recommandations du fabricant. Les conditions d'amplification sont comme suit : 94 °C pendant 15 min puis 30 cycles de 94 °C pendant 20 s, 51 °C pendant 45 s, 72 °C pendant 45 s, puis une extension finale à 72 °C pendant 10 min.

Plusieurs épreuves de RT-PCR ciblant les gènes F, G et M ont été utilisées avec succès pour l'identification des sous-types ainsi que la détection ou le diagnostic des souches endémiques d'aMPV (20, 21, 24). La détermination de la séquence nucléotidique et l'analyse phylogénétique du gène G ont été utilisées pour génotyper les aMPV de sous-types A, B et C et ces approches constituent la démarche recommandée pour l'identification du sous-type d'un aMPV non identifié. Des protocoles de RT-PCR ont été décrits pour l'analyse des séquences nucléotidiques du gène G (22, 23). Des protocoles pour l'identification de l'ARN des sous-types A et B dans les prélèvements diagnostiques ont aussi été décrits (31), de même que des protocoles pour la détection des virus de sous-types A et C (36). L'isolement des aMPV est difficile chez le poulet et n'a que rarement réussi, pour cette raison les tests moléculaires ont principalement été utilisés pour la détection des aMPV chez le poulet (11, 25). Il est important de garder en mémoire que la RT-PCR détecte de l'ARN viral, et non du virus infectieux, de sorte que la signification d'un signal positif en PCR doit encore être interprétée avant de conclure à la présence d'une infection virale active, tout particulièrement si des vaccins vivants sont utilisés en routine.

2. Épreuves sérologiques

Du fait des difficultés rencontrées pour isoler et identifier les aMPV, la sérologie représente la méthode la plus répandue pour le diagnostic des infections par les aMPV, tout particulièrement dans les troupeaux non vaccinés. La méthode ELISA est la plus utilisée, toutefois des épreuves de neutralisation virale, de microimmunofluorescence et d'immunodiffusion ont été aussi utilisées (39, 40). De nombreux kits ELISA commerciaux ou développés par les laboratoires pour leur propre usage sont disponibles et conviennent à l'analyse des sérums de dinde ou de poulet, des différences de sensibilité et de spécificité entre kits commerciaux ont toutefois été décrites (27, 28). Des kits ELISA basés sur le principe de la compétition ou du blocage, incluant un anticorps monoclonal spécifique des aMPV ont été développées. Ces kits sont censés avoir une sensibilité et une spécificité larges et adaptées à tous les sous-types d'aMPV. Des antigènes ELISA préparés au laboratoire, selon le protocole décrit ci-après, ont été préparés à partir de supports de culture variés, incluant plusieurs types de cultures cellulaires ou des cultures d'anneaux de trachée (6, 11). D'une manière générale, les anticorps anti-aMPV sont moins bien détectés lorsqu'une souche d'aMPV hétérologue est utilisée comme aMPV, même si les souches virales apparaissent étroitement apparentées dans le test de neutralisation virale (11). La situation est encore compliquée par le fait que différents tests ELISA présentent une capacité variable à détecter les anticorps post-vaccinaux selon les souches virales utilisées comme antigène pour sensibiliser les plaques (16, 40). Des kits fabriqués au laboratoire ont largement été utilisés pour la surveillance des souches d'aMPV endémiques. Idéalement, à la fois des sérums prélevés en phase aiguë et des sérums prélevés chez les sujets convalescents devraient être soumis à l'analyse. Chez le poulet, les réponses sérologiques à l'infection par les aMPV sont faibles par rapport à ce qui est observé chez la dinde (12).

• Épreuve immuno-enzymatique

Le virus est propagé sur fibroblastes embryonnaires de poulet (CEF) ou sur cellules Vero jusqu'à ce que 70 à 100 % du tapis cellulaire soient simultanément infectés (3-4 jours). Le surnageant de culture est décanté et le tapis cellulaire rincé avec du PBS (pH 7,2). Le tapis cellulaire est lysé avec 0,5 ml par fiole de 75 cm² d'une solution détergente non-ionique à 0,5 % (IGEPAL CA-630 ou Nonidet P-40), sur agitateur rotatif, pendant 1 h à 4 °C. Après la rupture des membranes des cellules lysées, la totalité du lysat antigénique viral est clarifiée à 3 000 *g* pendant 15 min. Des cultures cellulaires non infectées sont traitées selon le même protocole pour produire un antigène témoin négatif. Des dilutions sériées de l'antigène sont testées vis à vis de dilutions sériées d'un anticorps anti-IgG de l'espèce étudiée couplé à la peroxydase de raifort, selon le principe du titrage en échiquier, pour déterminer les dilutions optimales de l'antigène et du conjugué. Les antigènes aMPV et témoin, dilués de façon appropriée dans du tampon de sensibilisation

carbonate/bicarbonate, sont utilisés (100 µl) pour sensibiliser des plaques de microtitration à fond plat (6). Chaque sérum est testé vis à vis de l'antigène aMPV et de l'antigène témoin en vue du calcul du ratio S/P. Les plaques sensibilisées sont incubées à 4 °C pendant une nuit et lavées 5 fois avant utilisation avec une solution de lavage contenant du Tween 20 (6), ou 3 fois avant stockage prolongé à –70 °C. La solution de lavage résiduelle est laissée dans les plaques lorsque celles-ci sont congelées. Après stockage, les plaques sont décongelées jusqu'à température ambiante, puis lavées 2 fois et secouées jusqu'à être sèches.

- i) Diluer les sérums à tester au 1/40^e dans le tampon de dilution/blocage (6).
- ii) Distribuer 50 µl des sérums à tester et des dilutions appropriées des sérums positif et négatif dans les puits sensibilisés avec l'antigène aMPV et dans ceux sensibilisés avec l'antigène témoin.
- iii) Incuber à température ambiante pendant 1 h.
- iv) Laver les plaques cinq fois avec la solution de lavage contenant du Tween 20.
- v) Distribuer dans chaque puits 50 µl d'une dilution appropriée de l'anticorps anti-IgG de l'espèce étudiée couplé à la peroxydase de raifort et incuber 1 h à température ambiante.
- vi) Laver les plaques cinq fois avec la solution de lavage contenant du Tween 20.
- vii) Distribuer dans chaque puits 100 µl d'une solution préalablement préparée de substrat ortho-phénylène diamine (OPD) et incuber 10 min à l'obscurité. Pour préparer le substrat OPD, mélanger 243 ml d'acide citrique 0,1 M à 257 ml d'hydrogène-phosphate disodique 0,2 M, ajuster le pH à 5,0 et rajouter de l'eau distillée qsp 1 litre.
- viii) Bloquer la réaction en distribuant 25 µl par puits d'acide sulfurique 2,5 M.
- ix) Lire les absorbances à 490/450 nm.

Les résultats sont exprimés sous la forme de la différence d'absorbance entre le puits sensibilisé avec l'antigène aMPV et le puits sensibilisé avec l'antigène témoin négatif. Calculer la moyenne de cette différence à partir des deux couples de puits (antigène positif/antigène témoin) utilisés pour chaque sérum testé. Un échantillon avec une différence d'absorbance entre les antigènes positifs et témoin supérieure à 0,2 est considéré comme positif. Des réactions non spécifiques positives occasionnelles sont observées comme avec tout test ELISA, tout spécialement avec les sérums de poulet, et une épreuve d'immunofluorescence peut être mise en œuvre à titre de confirmation.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Cette section est en cours d'étude, il est prévu d'ajouter les informations relatives aux vaccins à la version en ligne du *Manuel Terrestre*, dès son approbation par l'Assemblée mondiale des Délégués de l'OIE.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALKALAF A.N., WARD L.A., DEARTH R.N. & SAIF Y.M. (2002). Pathogenicity, transmissibility and tissue distribution of avian pneumovirus in turkey poult. *Avian Dis.*, **46**, 650–659.
2. BAYON-AUBOYER M.H.C., JESTIN V., TOQUIN D., CERBONNEL M. & ETERRADOSSI N. (1999). Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Arch. Virol.*, **144**, 1091–1109.
3. BAYON-AUBOYER M.H.C., TOQUIN A.D. & ETERRADOSSI N. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J. Gen. Virol.*, **81**, 2723–2733.
4. BENNETT R.S., NEZWORSKI J., VELAYUDHAN B.T., NAGRAJA K.V., ZEMAN D.H., DYER N., GRAHAM T., LAUER D.C., NJENGA M.K. & HALVORSON D.A. (2004). Evidence of avian pneumovirus spread beyond Minnesota among wild and domestic birds in central North America. *Avian Dis.*, **48**, 902–908.
5. BUYS S.B. & DU PREEZ J.H. (1989). The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **56**, 87–98.

6. CHIANG S.J., DAR A.M., GOYAL S.M., NAGARAJA K.V., HALVORSON D.A. & KAPUR V. (2000). A modified enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avian pneumovirus antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 381–384.
7. COLLINS M.S. & GOUGH R.E. (1988). Characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis. *J. Gen. Virol.*, **69**, 909–916.
8. COLLINS M.S., GOUGH R.E. & ALEXANDER D.J. (1993). Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antibody and mouse monoclonal antibodies. *Avian Pathol.*, **22**, 469–479.
9. COOK J.K.A. (2000). Avian rhinotracheitis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **19**, 602–613.
10. COOK J.K.A. (2000). Avian pneumovirus infections of turkey and chickens. *Vet. J.* **160**, 118–125.
11. COOK J.K.A. & CAVANAGH D. (2002). Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathol.*, **31**, 117–132.
12. COOK J.K.A., ELLIS M.M. & HUGGINS M.B. (1991). The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poults inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria. *Avian Pathol.*, **20**, 155–166.
13. COOK J.K.A., HUGGINS M.B., ORVELL S.J. & SENNE D.A. (1999). Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. *Avian Pathol.*, **28**, 607–617.
14. COOK J.K.A., JONES B. V., ELLIS M. M., LI J. & CAVANAGH D. (1993b). Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. *Avian Pathol.*, **22**, 257–273.
15. COOK J.K.A., KINLOCH S., & ELLIS M.M. (1993a). *In vitro* and *in vivo* studies in chickens and turkeys on strains of turkey rhinotracheitis virus isolated from the two species. *Avian Pathol.*, **22**, 157–170.
16. ETERRADOSSI N., TOQUIN D., GUITTET M & BENNEJEAN G. (1995). Evaluation of different turkey rhinotracheitis viruses used as antigens for serological testing following live vaccination and challenge. *J. Vet Med. [B]*, **42**, 175–186.
17. GOUGH R.E. (2003). Avian pneumoviruses. *In: Diseases of Poultry*, eleventh edition, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D. eds. Blackwell Publishing, 92–99.
18. GOUGH R.E., COLLINS M.S., COX W.J. & CHETTLER N.J. (1988). Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus. *Vet. Rec.*, **123**, 58–59.
19. GOUGH R.E., MANVELL R.J., DRURY S.E.N. & PEARSON D.B. (1994). Isolation of an avian pneumovirus from broiler chickens. *Vet. Rec.*, **134**, 353–354.
20. GOYAL S.M., CHIANG S.J., DAR A.M., NAGARAJA K.V., SHAW D.P., HALVORSON D.A. & KAPUR V. (2000). Isolation of avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 166–168.
21. JIRJIS F.F., NOLL S.L., HALVORSON D.A., NAGARAJA K.V., MARTIN F. & SHAW D.P. (2004). Effects of bacterial coinfection on the pathogenesis of Avian Pneumovirus infection in turkeys. *Avian Dis.*, **48**, 34–49.
22. JUHASZ K., & EASTON A. J. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.*, **75**, 2873–2880.
23. LWAMBA H.C.M., ALVAREZ R., WISE M.G., YU Q., HALVORSON D., NJENGA M.K. & SEAL B.S. (2005). Comparison of full-length genome sequence of Avian metapneumovirus subtype C with other paramyxoviruses. *Virus Res.*, **107**, 83–92.
24. MAJO N., ALLAN G.M., O'LOAN C.J., PAGES A. & RAMIS A.J. (1995). A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chickens, turkey poults and broiler breeders experimentally infected with turkey rhinotracheitis virus. *Avian Dis.*, **39**, 887–896.
25. MASE M.S., ASAH I., IMARI K., NAKAMURA K & YAMAGUCHI S. (1996). Detection of turkey rhinotracheitis virus from chickens with swollen head syndrome by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *J. Vet. Med. Sci.*, **58**, 359–361.

26. MASE M., YAMAGUCHI S., TSUKAMOTO K., IMADA T., IMAI K. & NAKAMURA K. (2003). Presence of avian pneumovirus subtypes A and B in Japan. *Avian Dis.*, **47**, 481–484.
27. MCFARLANE-TOMS I.P. & JACKSON R.J.H. (1998). A comparison of three commercially available ELISA tests for detecting antibodies to turkey rhinotracheitis virus (TRTV). *Proceedings of the International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus infections in Poultry*, Rauischholzhausen, Germany, 15–18 June, pp 26–37.
28. MEKKLES D. R. & DE WIT J.J. (1999). Comparison of three commercial ELISA kits for the detection of turkey rhinotracheitis virus antibodies. *Avian Pathol.*, **27**, 301–305.
29. MORLEY A.J. & THOMSON D.K. (1984). Swollen-head syndrome in broiler chickens. *Avian Dis.*, **28**, 238–243.
30. NAYLOR C.J. & JONES R.C. (1993). Turkey rhinotracheitis: a review. *Vet. Bull.*, **63**.
31. NAYLOR C., SHAW K., BRITTON P. & CAVANAGH D. (1997). Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain. *Avian Path.*, **26**, 327–338.
32. NJENGA M.K., LWAMBS H.M. & SEAL B.S. (2000). Metapneumoviruses in birds and humans. *Virus Res.*, **91**, 163–169.
33. O'BRIEN J.D.P. (1985). Swollen head syndrome in broiler breeders. *Vet. Rec.*, **117**, 619–620.
34. PATTISON M., CHETTLER N., RANDALL C.J. & WYETH P.J. (1989). Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. *Vet. Rec.*, **125**, 229–231.
35. PEDERSEN J.C., ROLAND D.L., REYNOLDS D.L. & ALI A. (2000). The sensitivity and specificity of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the avian pneumovirus (Colorado strain). *Avian Dis.*, **44**, 681–685.
36. PEDERSEN J.C., SENNE D.A., PANIGRAHY B. & REYNOLDS D.L. (2001). Detection of avian pneumovirus in tissue and swab specimens from infected turkeys. *Avian Dis.*, **45**, 581–592.
37. PRINGLE C.R. (1998). Virus Taxonomy-San Diego. *Arch. Virol.*, **143**, 1449–1459.
38. SABARA M.I. & LARENCE J.E. (2002). Evaluation of a Japanese quail fibrosarcoma cell line (QT-35) for use in the propagation and detection of metapneumovirus. *J. Virol. Methods*, **102**, 73–81.
39. SABARA M.I. & LARENCE J.E. (2003). Plaque assay for avian metapneumovirus using a Japanese quail fibrosarcoma cell line (QT-35). *J. Virol. Methods*, **107**, 9–14.
40. SABARA M.I. & LARENCE J.E. (2003). Use of a Japanese quail fibrosarcoma cell line (QT-35) in serologic assays to determine the antigenic relationship of avian metapneumoviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 447–453.
41. SENNE D.A., EDSON R.K., PEDERSEN J.C. & PANIGRAHY B. (1997). Avian pneumovirus update. In: *Proceedings of the American Veterinary Medical Association, 134th Annual Congress*, Reno, Nevada, July 1997, p 190.
42. SHIN H.J., JIRJIS F.F., KUMAR M.C., NJENGA M.K., SHAW D.P., NOLL S.L., NAGARAJA K.V. & HALVORSEN D.A. (2002). Neonatal avian pneumovirus infection in commercial turkeys. *Avian Dis.*, **46**, 239–244.
43. SHIN H.J., MCCOMB B., BACK A., SHAW D.P., HALVORSON D.A. & NAGARAJA K. (2000). Susceptibility of broiler chicks to infection by avian pneumovirus of turkey origin. *Avian Dis.*, **44**, 797–802.
44. SHIN H.J., NAGARAJA K.V., MCCOMB B., HALVORSON D.A., JIRJIS F.F., SHAW D.P., SEAL B.S. & NJENGA M.K. (2002a). Isolation of avian pneumovirus from mallard ducks that is genetically similar to viruses isolated from neighbouring commercial turkeys. *Virus Res.*, **83**, 207–212.
45. STUART J.C. (1989). Rhinotracheitis: turkey rhinotracheitis (TRT) in Great Britain. Recent Advances in Turkey Science. *Poultry Science Symposium*, **21**, 217–224.
46. TANAKA M., TANUMA H., KOKUMAI N., OISHI E., OBI T., HIRAMATSU K. & SHIMIZU Y. (1995). Turkey rhinotracheitis virus isolated from broiler chicken with swollen head syndrome in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **57**, 939–945.

47. TOQUIN D., BAYON-AUBOYER M.H., ETTERADOSSI N., MORIN H. & JESTIN V. (1999). Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. *Vet. Rec.*, **145**, 680.
48. TOQUIN D., DE BOISSESON C., BEVEN V., SENNE D.A. & ETERRADOSSI N. (2003). Subgroup C avian metapneumovirus (MPV) and the recently isolated human MPV exhibit a common organization but have extensive sequence divergence in their putative SH and G genes. *J. Gen. Virol.*, **84**, 2169–2178.
49. VELEYUDHAN B.T., MCCOMB B., BENNETT R.S., LOPES V.C., SHAW D., HALVORSON D.A., NAGARAJA K.V. (2005). Emergence of a virulent type C avian metapneumovirus in turkeys in Minnesota. *Avian Dis.*, **49**, 520–526.
50. YU Q., DAVIS P.J., LI J. & CAVANAGH D. (1992). Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveals a gene order different from that of respiratory syncytial virus. *Virology*, **186**, 426–434.
51. ZANDE S., VAN DE NAUWYNCK H., DE JONGHE S. & PENSART M. (1999). Comparative pathogenesis of a subtype A with a subtype B avian pneumovirus in turkeys. *Avian Pathol.*, **28**, 239–244.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la Rhinotrachéite infectieuse de la dinde (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel Terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).