



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 2**

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. 2 : ISBN 978-92-9044-754-2

© 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 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 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 2

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

SECTION 2.4.	BOVIDAE	
Chapitre 2.4.1.	Anaplasmose bovine.....	655
Chapitre 2.4.2.	Babésiose bovine.....	667
Chapitre 2.4.3.	Brucellose bovine.....	681
Chapitre 2.4.4.	Cysticercose bovine.....	720
Chapitre 2.4.5.	Campylobactériose génitale bovine.....	721
Chapitre 2.4.6.	Encéphalopathie spongiforme bovine	732
Chapitre 2.4.7.	Tuberculose bovine.....	745
Chapitre 2.4.8.	Diarrhée virale bovine.....	761
Chapitre 2.4.9.	Péripleumonie contagieuse bovine.....	777
Chapitre 2.4.10.	Dermatophilose.....	791
Chapitre 2.4.11.	Leucose bovine enzootique.....	795
Chapitre 2.4.12.	Sépticémie hémorragique.....	806
Chapitre 2.4.13.	Rhinotrachéite infectieuse bovine/Vulvovaginite pustuleuse infectieuse.....	821
Chapitre 2.4.14.	Dermatose nodulaire contagieuse.....	838
Chapitre 2.4.15.	Coryza gangréneux.....	850
Chapitre 2.4.16.	Theilériose.....	862
Chapitre 2.4.17.	Trichomonose.....	880
Chapitre 2.4.18.	Trypanosomes (transmises par les tsé-tsé)	889
SECTION 2.5.	EQUIDAE	
Chapitre 2.5.1.	Peste équine.....	901
Chapitre 2.5.2.	Métrite contagieuse équine.....	917
Chapitre 2.5.3.	Dourine.....	925
Chapitre 2.5.4.	Lymphangite épizootique.....	933
Chapitre 2.5.5.	Encéphalomyélite équine (de l'Est et de l'Ouest).....	940
Chapitre 2.5.6.	Anémie infectieuse des équidés.....	949
Chapitre 2.5.7.	Grippe équine.....	954
Chapitre 2.5.8.	Piroplasmoses équines.....	969
Chapitre 2.5.9.	Rhinopneumonie équine.....	979
Chapitre 2.5.10.	Artérite virale équine.....	990
Chapitre 2.5.11.	Morve.....	1006
Chapitre 2.5.12.	Gale des équidés.....	1017
Chapitre 2.5.13.	Variole équine.....	1018
Chapitre 2.5.14.	Encéphalomyélite équine vénézuélienne.....	1019

SECTION 2.6.	LAGOMORPHA	
Chapitre 2.6.1.	Myxomatose.....	1025
Chapitre 2.6.2.	Maladie hémorragique du lapin.....	1036
SECTION 2.7.	OVIDAE ET CAPRIDAE	
Chapitre 2.7.1.	Maladie de la frontière.....	1053
Chapitre 2.7.2.	Brucellose ovine et caprine (<i>Brucella ovis</i> exclue).....	1066
Chapitre 2.7.3/4.	Arthrite/encéphalite caprine et Maedi-visna.....	1076
Chapitre 2.7.5.	Agalaxie contagieuse.....	1086
Chapitre 2.7.6.	Pleuropneumonie contagieuse caprine.....	1095
Chapitre 2.7.7.	Avortement enzootique des brebis (Chlamyidiose ovine).....	1109
Chapitre 2.7.8.	Maladie du mouton de Nairobi.....	1117
Chapitre 2.7.9.	Épididymite contagieuse ovine (<i>Brucella ovis</i>).....	1118
Chapitre 2.7.10.	Adénomatose pulmonaire ovine (adénocarcinome).....	1128
Chapitre 2.7.11.	Peste des petits ruminants.....	1133
Chapitre 2.7.12.	Salmonellose (<i>S. abortusovis</i>).....	1145
Chapitre 2.7.13.	Tremblante.....	1146
Chapitre 2.7.14.	Clavelée et variole caprine.....	1157
SECTION 2.8.	SUIDAE	
Chapitre 2.8.1.	Peste porcine africaine.....	1169
Chapitre 2.8.2.	Rhinite atrophique du porc.....	1185
Chapitre 2.8.3.	Peste porcine classique (hog cholera).....	1195
Chapitre 2.8.4.	Encéphalite due au virus Nipah.....	1212
Chapitre 2.8.5.	Brucellose Porcine (<i>Brucella suis</i>).....	1213
Chapitre 2.8.6.	Cysticercose porcine.....	1221
Chapitre 2.8.7.	Syndrome dysgénésique et respiratoire du porc.....	1222
Chapitre 2.8.8.	Grippe porcine.....	1236
Chapitre 2.8.9.	Maladie vésiculeuse du porc.....	1248
Chapitre 2.8.10.	Encéphalomyélite à Teschovirus (anciennement encéphalomyélite à entérovirus ou maladie de Teschen/Talfan).....	1256
Chapitre 2.8.11.	Gastro-entérite transmissible.....	1264
SECTION 2.9.	AUTRES MALADIES¹	
Chapitre 2.9.1.	Maladies animales à Bunyavirus (Fièvre de la Vallée du Rift non comprise)*.....	1277
Chapitre 2.9.2.	Variole des camélidés.....	1290
Chapitre 2.9.3.	<i>Campylobacter jejuni</i> et <i>Campylobacter coli</i>	1299
Chapitre 2.9.4.	Cryptosporidioses.....	1307
Chapitre 2.9.5.	Cysticercoses*.....	1332
Chapitre 2.9.6.	Maladies dues aux virus Hendra et Nipah.....	1344
Chapitre 2.9.7.	<i>Listeria monocytogenes</i>	1356
Chapitre 2.9.8.	Gales*.....	1374
Chapitre 2.9.9.	Salmonelloses*.....	1387
Chapitre 2.9.10.	Toxoplasmose.....	1406
Chapitre 2.9.11.	<i>Escherichia coli</i> vérocytotoxinogène.....	1417
Chapitre 2.9.12.	Zoonoses transmissibles depuis les primates autres que l'homme.....	1430
PARTIE 3	EXPERTS DE RÉFÉRENCE DE L'OIE ET INDEX DES MALADIES	
	Liste des Laboratoires de référence et des Centres collaborateurs de l'OIE (Mai 2008).....	1433
	Liste des maladies classées par ordre alphabétique.....	1465

¹ Les maladies de cette liste, marquées avec un astérisque, sont incluses dans des sections consacrées à une espèce en particulier de la liste de l'OIE, mais ces chapitres du *Manuel terrestre* couvrent plusieurs espèces et donnent ainsi une description plus générale.

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.	Mycoplasmoses aviaires (<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.	Anaplasmoses 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.	Cysticersoses	–	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'Hémagglutination
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 $\frac{1}{4}$, 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. *Péripleumonie 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
(Chlamydiae 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

*

* *

SECTION 2.4.

BOVIDAE

CHAPITRE 2.4.1.

ANAPLASMOSE BOVINE

RÉSUMÉ

Définition de la maladie : l'anaplasmose bovine est due à l'infection par *Anaplasma marginale*. Une seconde espèce, *A. centrale* est connue depuis longtemps. Le fait qu'elle représente une espèce séparée est incertain. *Anaplasma marginale* est responsable de presque tous les cas de maladies cliniques. Une troisième espèce, *A. phagocytophilum*, a été signalée récemment comme pouvant infecter les bovins. Cependant, l'infection naturelle semble rare et *A. phagocytophilum* n'entraîne pas de maladie clinique. *Anaplasma marginale* est classé dans le genre *Anaplasma* appartenant à la famille des Anaplasmataceae et à l'ordre des Rickettsiales.

Description de la maladie : une anémie et un ictère sont des signes caractéristiques de l'anaplasmose, mais la maladie ne peut être que confirmée par l'identification de l'organisme. Une fois infecté, le bovin peut rester porteur pendant toute sa vie et l'identification de ces animaux dépend de la détection des anticorps spécifiques par des épreuves sérologiques, ou de l'ADN rickettsial en utilisant des techniques d'amplification.

Identification de l'agent pathogène : l'examen microscopique d'étalements de sang ou d'organes, coloré avec le colorant de Giemsa est la méthode la plus utilisée pour identifier *Anaplasma* chez des animaux cliniquement affectés. Dans ces étalements, *A. marginale* ressemble à des corps denses, ronds et intra-érythrocytaire, d'un diamètre d'environ 0,3 à 1,0 µm majoritairement localisés à la périphérie des érythrocytes. *Anaplasma centrale* est similaire en apparence, mais la majorité des organismes ne sont pas localisés en bordure des érythrocytes. Il peut être difficile de différencier *A. marginale* d'*A. centrale* sur des frottis colorés notamment lors de rickettsémies faibles. Des colorants commerciaux donnant des colorations rapides d'*Anaplasma* sont disponibles dans certains pays.

Il est important que les étalements soient bien préparés et qu'ils soient exempts d'impuretés. Des étalements à partir de bovins vivants doivent être préférentiellement préparés à partir de sang pris à la veine jugulaire ou au niveau d'autres gros vaisseaux. Pour le diagnostic post mortem, les étalements doivent être préparés à partir d'organes internes (foie, reins, cœur, poumons) et à partir de sang contenu dans les vaisseaux périphériques, particulièrement si l'état de décomposition est avancé.

Épreuves sérologiques : une épreuve immuno-enzymatique de compétition (ELISA-c) a révélé une bonne sensibilité dans la détection des animaux porteurs. Les épreuves d'agglutination sur carte, d'ELISA indirect, de dot-ELISA et d'immunofluorescence indirecte peuvent aussi être utilisées. La réaction de fixation du complément (FC) n'est plus considérée comme un test fiable pour la certification de la maladie dans des animaux individuels en raison d'une sensibilité variable. Des réactions croisées entre les *Anaplasma* spp peuvent compliquer l'interprétation des résultats sérologiques. En général, le ELISA-c a une bonne spécificité avec des réactions croisées bien connues entre *A. marginale* et *A. centrale*.

Les épreuves basées sur les acides nucléiques ont été utilisées expérimentalement et permettent de détecter la présence d'infection à bas niveau chez des bovins porteurs et dans les tiques vectrices. Des précautions doivent être prises avec les épreuves basées sur la PCR à des fins de

diagnostic puisque une réaction nichée est nécessaire pour l'identification des porteurs à bas niveau et des amplifications non spécifiques peuvent exister.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : des vaccins vivants sont utilisés dans différents pays pour protéger les bovins contre l'infection à *A. marginale*. Un vaccin contenant *A. centrale* vivant est le plus largement utilisé et donne une protection partielle lors d'une épreuve avec *A. marginale* virulent.

Le vaccin *Anaplasma centrale* est fourni sous forme refroidie ou congelée. Le contrôle qualité est très important comme pour les autres agents véhiculés par le sang, qui peuvent être présent chez le bovin donneur pouvant contaminer le vaccin et être largement disséminé. Pour cette raison, le vaccin congelé est recommandé puisque il permet à travers le contrôle qualité post-production, de limiter les risques de contamination par d'autres agents pathogènes.

Le vaccin *Anaplasma centrale* n'est pas entièrement sûr. Une recommandation pratique est de restreindre son utilisation, autant que possible, aux veaux, car l'immunité non spécifique minimisera le risque de certaines réactions au vaccin qui peuvent nécessiter un traitement à la tétracycline ou l'imidocarb. L'immunité partielle se développe entre 6 et 8 semaines et dure pendant plusieurs années après une seule vaccination.

A. INTRODUCTION

Les épisodes d'anaplasmoses bovines sont principalement dus à *Anaplasma marginale*. *Anaplasma centrale* est capable de provoquer à des degrés modérés de l'anémie, mais les épisodes cliniques sur le terrain sont extrêmement rares. Des appendices associés au corps d'*Anaplasma* ont été observés dans certains isolats d'*A. marginale* (19). Bien que ce parasite ait été nommé *A. caudatum*, il n'est pas considéré comme une espèce à part. Une troisième espèce, *A. phagocytophilum*, a été signalée comme pouvant infecter les bovins. Cependant, l'infection naturelle est rare et *A. phagocytophilum* n'entraîne pas de maladie clinique (8, 20).

Anaplasma marginale existe dans certains pays tropicaux et subtropicaux et dans certaines régions aux climats tempérés. *Anaplasma centrale* a été décrit à l'origine, en Afrique du Sud. L'organisme a depuis été importé dans d'autres pays (incluant l'Australie, et certains pays d'Amérique du Sud, d'Asie du Sud Est et du Moyen-Orient) pour l'utilisation comme vaccin contre *A. marginale*.

Les espèces d'*Anaplasma* ont été décrites comme des protozoaires parasites, mais des recherches ont montré qu'elles n'avaient pas les attributs justifiant cette description. Depuis la dernière grande révision de la taxonomie en 2001 (9), la Famille *Anaplasmataceae* (Ordre des *Rickettsiales*) est maintenant composée de quatre genres, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* et *Wolbachia*. Le genre *Aegyptianella* est maintenu dans la Famille *Anaplasmataceae* comme un genre *incertae sedis*. Après révision, le genre *Anaplasma* comprend maintenant *Anaplasma marginale* comme espèce-type, *A. phagocytophilum* (précédemment *Ehrlichia phagocytophila*), *E. equi* et l'agent non classé de l'ehrlichiose granulocytaire humaine, *A. platys* et *A. bovis*. *Haemobartonella* et *Eperythrozoon* sont, à l'heure actuelle, considérés comme très apparentés aux mycoplasmes.

Les espèces d'*Anaplasma* sont transmises soit mécaniquement soit biologiquement par des vecteurs arthropodes. Des revues basées sur une étude de transmissions expérimentales listent jusqu'à 19 tiques différentes comme vecteurs d'*A. marginale* (15, 21). Ce sont : *Argas persicus*, *Ornithodoros lahorensis*, *Boophilus annulatus*, *B. calcaratus*, *B. decoloratus*, *B. microplus*, *Dermacentor albipictus*, *D. andersoni*, *D. hunteri*, *D. occidentalis*, *D. variabilis*, *Hyalomma excavatum*, *H. rufipes*, *Ixodes ricinus*, *I. scapularis*, *Rhipicephalus bursa*, *R. evertsi*, *R. sanguineus*, et *R. simus*. Les auteurs concluent que pour certains travaux, incluant ceux sur *R. bursa*, *H. excavatum* et *O. lahorensis*, ne sont pas convaincants et que les tiques identifiées comme *A. persicus* étaient probablement *A. sanchezi* ou *A. radiatus*. La transmission intrastadiale et transtadiale est le mode usuel, même dans l'espèce *Boophilus* qui n'a qu'un hôte. Les tiques mâles peuvent avoir un rôle particulièrement important comme vecteurs ; ils peuvent être infectés permanents et jouer le rôle de réservoir d'infection (17). La démonstration expérimentale de la compétence vectorielle n'implique pas nécessairement un rôle dans la transmission sur le terrain. Cependant, les espèces de *Boophilus* sont clairement des vecteurs importants d'anaplasmoses dans les pays comme l'Australie et les pays d'Afrique et certaines espèces de *Dermacentor* sont des vecteurs efficaces aux États-Unis d'Amérique (USA).

De nombreux autres arthropodes ont été impliqués comme vecteurs mécaniques particulièrement aux USA. Des transmissions expérimentales ont été démontrées avec un certain nombre d'espèces de *Tabanus* (taons) et avec des moustiques du genre *Psorophora* (15, 33). L'importance de ces insectes dans la transmission naturelle de l'anaplasmose n'a jamais été bien documentée, et semble varier de région à région. *Anaplasma marginale* peut aussi être transmis pendant la vaccination contre d'autres maladies sauf à utiliser une aiguille neuve et stérile

pour vacciner chaque animal. Des transmissions similaires par le biais d'instruments chirurgicaux non stérilisés ont été rapportées.

Les vecteurs biologiques d'*A. centrale* sont des tiques multi-hôtes en Afrique incluant *R. simus*. La tique du bétail (*B. microplus*) n'a jamais été décrite comme vecteur. Ce point est d'importance quand *A. centrale* est utilisé comme vaccin dans des régions infestées par *B. microplus*.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Les signes cliniques les plus marquants de l'anaplasmose sont l'anémie et l'ictère, ce dernier apparaissant tardivement dans le développement de la maladie. Il n'y a pas d'hémoglobinémies ni d'hémoglobinurie ce qui peut aider dans le diagnostic différentiel entre anaplasmose et babésiose qui sont souvent des maladies enzootiques dans les mêmes régions. La maladie ne peut être confirmée que par l'identification de l'organisme.

1. Identification de l'agent pathogène

Les échantillons à partir de bovins vivants sont des étalements de sang à partir de sang collecté sur anti-coagulant. Les étalements séchés à l'air libre peuvent être conservés correctement à température ambiante pendant au moins 1 semaine. L'échantillon de sang sur anti-coagulant doit être maintenu et transféré à 4 °C, jusqu'à ce qu'il arrive au laboratoire en quelques heures. Cet échantillon est utile pour préparer des étalements frais si ceux qui sont fournis ne sont pas satisfaisants. Par ailleurs, un volume faible de cellules ou d'érythrocytes peut aider à impliquer *Anaplasma* quand seulement un petit nombre de parasites sont détectés dans les étalements, comme c'est souvent le cas dans la phase de rémission de la maladie.

Contrairement à *Babesia bovis*, *Anaplasma* ne s'accumule pas dans les capillaires, aussi du sang provenant de la jugulaire ou d'autres gros vaisseaux est nécessaire. Du fait de la difficulté à distinguer la morphologie d'*Anaplasma*, il est essentiel que les étalements soient bien préparés, exempts de matière étrangère comme des débris qui peuvent désorienter le diagnostic. Les étalements épais utilisés pour le diagnostic de la babésiose ne sont pas adaptés pour le diagnostic de l'anaplasmose car *Anaplasma* est difficile à identifier quand il se dissocie des érythrocytes.

Les échantillons d'animaux morts peuvent être : des étalements fins (séchés à l'air) de foie, de rein, de cœur, de poumons et à partir de sang veineux périphérique. Ce dernier est particulièrement recommandé s'il doit y avoir un délai avant l'examen *post mortem*. Dans ces circonstances, les contaminations bactériennes des étalements d'organes font que l'identification d'*Anaplasma* devient équivoque. Les étalements de cerveaux qui sont utiles pour le diagnostic de certaines formes de babésioses ne sont pas utilisés pour le diagnostic de l'anaplasmose, mais peuvent être inclus pour un diagnostic différentiel quand c'est approprié.

Le sang d'organes, plutôt que les tissus d'organes, est requis pour la préparation des étalements, le but étant de pouvoir examiner des érythrocytes intacts pour évaluer la présence d'*Anaplasma*. Les étalements de sang à partir d'organes pourront être conservés à température ambiante pendant plusieurs jours.

Les étalements de sang ou à partir d'organes peuvent être colorés au colorant de Giemsa à 10 % pendant environ 30 min après fixation dans l'alcool absolu pendant 1 min. Après coloration, les étalements sont rincés 3 ou 4 fois à l'eau du robinet pour enlever le surplus de colorant et sont ensuite séchés à l'air libre. Les conditions de la coloration de Giemsa varient d'un laboratoire à l'autre. Des colorants disponibles dans le commerce et qui donnent une coloration rapide des *Anaplasma* existent dans certains pays¹. Les étalements sont examinés sous huile à immersion à un grossissement de $\times 700$ à $\times 1\,000$.

Dans les étalements colorés au Giemsa, *Anaplasma marginale* apparaît dense, rond et fortement coloré dans les corps intra-érythrocytaires d'un diamètre d'environ 0,3 à 1 μm . La plupart de ces corps sont localisés sur ou proche du bord des érythrocytes. Cette caractéristique permet de distinguer *A. marginale* de *A. centrale*, puisque cette dernière a une localisation centrale dans l'érythrocyte. Cependant, la différenciation de ces deux espèces dans les étalements est parfois difficile, notamment lors de rickettsémies faibles.

Le pourcentage d'érythrocytes infectés varie avec le stade et la sévérité de la maladie. Un maximum de parasitémie de 50 % peut se produire avec *A. marginale*. Des infections multiples d'érythrocytes individuels sont communes pendant la période où la parasitémie est la plus élevée.

¹ Les colorants disponibles dans le commerce incluent Camco-Quik et Diff-Quik, Baxter Scientific Products, McGaw Park, Illinois, USA, et Hema 3 et Hema-Quik, Curtin-Matheson, Houston, Texas, USA.

L'infection devient visible au microscope entre 2 et 6 semaines suivant la transmission. Pendant la phase clinique, la parasitémie double approximativement chaque jour jusqu'à environ 10 jours et ensuite diminue à un taux similaire. Une anémie assez sévère peut persister pendant quelques semaines après que les parasites soient devenus virtuellement indétectables dans les étalements sanguins. Après avoir récupéré de l'infection initiale, la plupart des bovins restent infectés de manière latente pour la vie.

Une procédure coûteuse, mais qui peut être justifiée occasionnellement pour confirmer une infection, particulièrement chez les bovins infectés de manière latente, est l'inoculation du sang de l'animal suspect à un veau splénectomisé. Une quantité (jusqu'à 500 ml) de sang du donneur (sur anti-coagulant) est inoculée par voie intraveineuse à un veau splénectomisé, qui est alors testé par l'examen d'étalement sanguin au moins tous les 2 à 3 jours. Si le donneur est infecté, *Anaplasma* sera observé dans les étalements du veau splénectomisé dans un délai de 4 semaines mais cette période peut être étendue à 8 semaines.

Des épreuves basées sur la détection des acides nucléiques d'*A. marginale* chez les bovins porteurs ont été récemment développées (11-13, 36). La sensibilité des méthodes basées sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) a été estimée à 0,0001 % d'érythrocytes infectés, mais à ce niveau seule une proportion des bovins porteurs serait détectée (11, 12). Une PCR nichée potentiellement spécifique et sensible a récemment été utilisée pour identifier des bovins porteurs d'*A. marginale* (36). Cette technique permet d'identifier 30 érythrocytes infectés par ml de sang, ce qui équivaut à une parasitémie d'approximativement 0,000001 %, bien au-dessous des plus bas niveaux chez les porteurs. Cependant, la PCR nichée pose des problèmes majeurs de contrôle qualité pour une utilisation de routine (36). Les laboratoires qui l'utilisent, ont des problèmes de spécificité du fait d'amplifications non spécifiques. Une étape additionnelle comme l'analyse par des enzymes de restriction, l'hybridation par Southern blot, ou le séquençage peuvent permettre de confirmer la spécificité du fragment amplifié par la PCR nichée.

En général, à moins que les animaux aient été traités ou qu'ils soient à une phase très précoce de l'infection (moins de 14 jours), la sérologie utilisant une méthode immuno-enzymatique de compétition (ELISA-c) ou l'épreuve d'agglutination sur carte (voir ci-dessous) est la méthode de choix pour détecter les animaux infectés.

2. Épreuves sérologiques

Les infections à *Anaplasma* persistent généralement pendant toute la vie de l'animal. Cependant, sauf dans certains cas de recrudescence, *Anaplasma* ne peut être aisément détecté dans des étalements sanguins après l'épisode de parasitémie. Aussi un certain nombre d'épreuves sérologiques ont été développées avec pour but la détection d'animaux infectés de manière permanente.

Une caractéristique du diagnostic sérologique de l'anaplasmose est qu'il est hautement variable en termes de sensibilité et de spécificité. Cela est dû en partie à l'évaluation inadaptée des épreuves qui utilisent un certain nombre d'animaux positifs et négatifs. La capacité de plusieurs tests à détecter des infections connues, de longues durées a rarement été évaluée. Exceptions faites pour la technique d'ELISA-c (voir ci-dessous) qui a été validée en utilisant des animaux vrais positifs et négatifs, définis par PCR nichée (36), et l'épreuve d'agglutination sur carte pour laquelle la sensibilité et la spécificité ont été évaluées par comparaison avec l'ELISA-C (24). Aussi, bien que la plupart des épreuves décrites dans cette partie soient utiles pour l'obtention de données épidémiologiques, faut-il les utiliser avec précaution pour certifier d'une maladie. Les deux techniques, l'ELISA-c et l'agglutination sur carte, sont décrites ci-dessous.

Il faut noter qu'il y a beaucoup de réactions croisées entre *A. marginale* et *A. centrale* dans les épreuves sérologiques. Bien que l'espèce infectante puisse être parfois identifiée en utilisant des antigènes de l'espèce homologue ou hétérologue, des résultats équivoques sont souvent obtenus.

a) Méthode immuno-enzymatique de compétition

Un test ELISA-c utilisant un antigène recombiné appelé rMSP5 et l'anticorps monoclonal spécifique anti-MSP5 s'est révélée sensible et spécifique pour la détection d'animaux infectés par *Anaplasma* (18, 27, 35, 37). Toutes les souches d'*Anaplasma marginale* testées, *A. ovis* et *A. centrale*, expriment l'antigène MSP5 et induisent des anticorps contre l'épitope immunodominant reconnu par l'anticorps monoclonal anti-MSP5. Une étude récente laisse penser que les anticorps de bovins expérimentalement infectés par *A. phagocytophilum* se révéleraient positifs avec l'ELISA-c (8). Cependant, dans une autre étude, aucune réaction croisée n'a été constatée et l'AcM utilisé dans le test ne réagissait pas avec le MSP5 d'*A. phagocytophilum* (35). Des travaux complémentaires sont nécessaires pour clarifier la situation. L'épreuve a montré une spécificité de 100 % en utilisant 261 sérums négatifs provenant d'une région non enzootique. Elle permet la détection des bovins infectés dès 16 jours après l'inoculation expérimentale par piqûre de tiques ou par injection de sang, elle détecte des bovins qui ont été infectés 6 ans plus tôt (18). En

détectant des bovins infectés de manière persistante, provenant d'une région d'enzootie pour l'anaplasmose et définis comme des vrais positifs ou négatifs par les épreuves de PCR nichée, l'ELISA-c a une sensibilité de 96 % et une spécificité de 95 % (36). Une étude indépendante utilisant un ELISA indirect (ELISA-i) valide l'utilisation de rMSP5 comme un antigène pour le diagnostic (32). Cependant, les premières études suggèrent que dans son format actuel, l'épreuve indirecte est moins sensible que l'épreuve d'ELISA-c (32).

Les résultats du test ELISA-c sont disponibles en moins de 2,5 h. Un kit de diagnostic commercialement disponible contient les instructions d'utilisation. En général le test est conduit comme décrit ci-dessous.

- **Réactifs du kit de diagnostic**

Une microplaque de 96-puits fixée avec l'antigène rMSP5,
 Une plaque de 96-puits fixée pour l'absorption/transfert du sérum pour réduire le bruit de fond,
 100 × l'anticorps monoclonal et le conjugué couplé à la peroxydase,
 Solution de lavage 10× et du tampon de dilution pour le conjugué prêt à l'emploi,
 Substrat et solution stop prêt à l'emploi,
 Témoins positif et négatif.

- **Protocole**

- i) Ajouter 70 µl du sérum non dilué à la plaque fixée pour l'absorption/transfert et incuber à température ambiante pendant 30 min ;
- ii) Transférer 50 µl par puits de sérum absorbé à la plaque fixée avec l'antigène rMSP5 et incuber à température ambiante pendant 60 min ;
- iii) Eliminer le sérum et laver la plaque 2 fois avec la solution de lavage diluée ;
- iv) Ajouter 50 µl/puits de l'anticorps monoclonal dilué et conjugué à la peroxydase à la plaque à laquelle a été fixée le rMSP5. Incuber à température ambiante pendant 20 min ;
- v) Éliminer l'anticorps monoclonal dilué et conjugué à la peroxydase et laver la plaque 4 fois avec la solution de lavage diluée ;
- vi) Ajouter 50 µl/puits de la solution substrat, couvrir la plaque avec une feuille et incuber 20 min à température ambiante ;
- vii) Ajouter 50 µl/puits de solution stop à la solution substrat déjà dans les puits et tapoter le bord de la plaque pour mélanger doucement le mélange ;
- viii) Lire les plaques dans un lecteur à 620 nm.

- **Validation**

La moyenne de la densité optique (DO) du témoin négatif doit varier de 0,40 à 2,1. Le pourcentage d'inhibition du témoin positif doit être supérieur ou égal à 30 %.

- **Interprétation des résultats**

Le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit :

$$100 - \frac{\text{DO de l'échantillon} \times 100}{\text{Moyenne de la DO du témoin négatif}} = \% \text{ d'inhibition}$$

Les échantillons dont le pourcentage est inférieur à 30 % sont négatifs. Les échantillons dont le pourcentage est supérieur ou égal à 30 % sont positifs.

La spécificité de l'ELISA-c avec l'antigène MSP5 peut être améliorée en utilisant un seuil plus élevé pour le pourcentage d'inhibition (5). Cependant les conséquences de ce changement sur la sensibilité n'ont pas été évaluées.

b) Épreuve d'agglutination sur carte

Les avantages de l'épreuve d'agglutination sur carte (CAT) sont la sensibilité aussi bien en laboratoire que sur le terrain et la rapidité : cette épreuve donne un résultat en quelques minutes. Les réactions non spécifiques peuvent poser problèmes et la subjectivité dans l'interprétation des résultats peut entraîner une variabilité dans l'interprétation du test. En outre, l'antigène CAT qui est une suspension de particules de

A. marginale, peut se révéler difficile à préparer et varier d'un lot à l'autre ou d'un laboratoire à l'autre. Des veaux splénectomisés sont infectés par voie intraveineuse avec du sang contenant des érythrocytes infectés par *Anaplasma*. Quand la parasitémie excède 50 %, les animaux sont saignés, les érythrocytes infectés sont lavés, lysés et les fantômes des érythrocytes ainsi que les particules d'*Anaplasma* sont culottés. Les culots sont soumis à un traitement aux ultra-sons, lavés et resuspendus dans une solution colorante pour produire la suspension d'antigène.

Le protocole légèrement modifiée par rapport à celui décrit à l'origine (1, 2) est le suivant :

- i) s'assurer que tous les composants sont à température constante entre 25 et 26 °C (cette température constante est critique pour l'épreuve) ;
- ii) sur chaque cercle de la carte test (une plaque en plastique transparente ou une plaque de glace marquée avec des cercles de 18 mm de diamètre), placer les uns à côté des autres mais sans les faire se toucher, 10 µl de bovine serum factors (BSF), 10 µl de sérum test et 5 µl d'antigène² CAT. Les témoins négatifs et faiblement positifs doivent être testés sur cette carte ;
Le sérum BSF est sélectionné d'un animal avec un haut niveau connu de congglutinine. Si le niveau de congglutinine est inconnu, du sérum frais provenant d'un animal sain, connu pour être exempt d'*Anaplasma* peut être utilisé. La race Jersey est souvent appropriée. Le BSF doit être conservé à -70 °C par petits aliquots, une fraction aliquote fraîche étant utilisée chaque fois que l'épreuve est réalisée. L'inclusion du BSF augmente la sensibilité de l'épreuve ;
- iii) bien mélanger. Après avoir mélangé chaque test, essuyer avec du papier propre pour éviter les contaminations croisées ;
- iv) placer la carte dans une chambre humide sur un plateau agitant (100 à 110 tr/min) pendant 7 min ;
- v) lire immédiatement. Des agrégats caractéristiques de l'antigène (graduée de +1 à +3) sont considérés comme un résultat positif. L'épreuve est considérée comme négative en l'absence de ces agrégats.

c) Test de fixation du complément

La réaction de fixation du complément (FC) a été largement utilisée pendant des années. Cependant sa sensibilité est variable (de 20 à 60 %) vraisemblablement en raison des différences dans les techniques de préparation de l'antigène et de sa faible reproductibilité. En outre, il a été démontré que la FC ne pouvait pas détecter un pourcentage élevé d'animaux porteurs (5). Il n'est pas non plus certain que la FC puisse détecter avant les autres tests les anticorps chez les animaux en phase aiguë (6, 24). Aussi le test de fixation du complément n'est-il plus recommandé comme une épreuve fiable pour détecter les animaux infectés.

d) Autres méthodes ELISA

Méthode immuno-enzymatique indirecte - un test ELISA indirect (i-ELISA) basée sur l'utilisation d'un antigène de globule rouge sanguin normal (antigène négatif) et d'un antigène provenant de globules rouges sanguins infectés par *A. marginale* (antigène positif) s'est révélée fiable pour détecter des sérums infectés par *A. marginale* (10). Bien que plus lourde que les épreuves utilisant un seul antigène, cette épreuve permet d'éliminer les sérums qui ont de hauts niveaux d'activité non spécifique du fait de la présence d'iso-anticorps contre les composants des globules rouges. L'épreuve a identifié correctement tous les 100 sérums connus pour être positifs et collectés à partir de bovins, jusqu'à 3 ans après l'infection, alors que 3 % des sérums négatifs, 2 % de sérums anti-*Babesia bovis* et 4 % anti-*B. bigemina* ont donné des faux positifs.

Méthode immuno-enzymatique par dépôt - une épreuve immuno-enzymatique par dépôt (dot-ELISA) a été décrit. Comparé au test i-ELISA, le dot-ELISA a l'avantage d'être rapide, bon marché et facile à réaliser. La sensibilité du dot-ELISA a été évaluée à 93 % et sa spécificité à 96 % (25).

e) Épreuve d'immunofluorescence indirecte

Du fait du nombre limité d'épreuves d'immunofluorescence indirecte (IFI) qui peuvent être réalisées chaque jour par un opérateur, d'autres épreuves sérologiques sont généralement préférées aux épreuves IFI. L'épreuve d'IFI est réalisée comme celle décrite pour la babésiose bovine dans le chapitre 2.4.2., excepté que du sang infecté par *A. marginale* est utilisé pour la préparation des étalements. Un grave problème avec cette épreuve est la fluorescence non spécifique. De l'antigène fabriqué à partir de sang collecté dès qu'une parasitémie adéquate (5 à 10 %) est obtenue, convient mieux à l'épreuve. La fluorescence non spécifique due aux anticorps adhérant aux érythrocytes infectés peut être réduite en lavant les érythrocytes dans un tampon contenant de la glycine acide avant la préparation des étalements (26). Les érythrocytes infectés

2 L'épreuve conduite aux USA et au Mexique utilise des volumes plus importants de réactifs: antigène (15 µl), sérum (30 µl), et bovine serum factor (30 µl) ; et le temps de réaction est de 4 min (voir l'étape iv)

sont alors lavés 2 fois dans du tampon glycine 0,1 M (pH 3,0, centrifugés à 1 000 *g* pendant 15 min à 4 °C) et ensuite 1 fois dans du PBS pH 7,4.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Plusieurs méthodes d'immunisation ont été utilisées pour protéger les bovins contre l'anaplasmosse dans les pays où la maladie est enzootique, mais aucune n'est parfaite (22). Une synthèse sur les vaccins et les antigènes de *A. marginale* a été récemment publiée (16). L'utilisation de l'agent le moins pathogène, *A. centrale*, qui donne des réactions croisées avec *A. marginale* est la méthode la plus acceptée, bien que pas utilisée en Amérique du Nord. Une autre méthode implique l'utilisation d'une souche de *A. marginale* atténuée par des passages sur des hôtes non bovins, comme les daims ou les moutons (34).

Dans cette section, la production de vaccin vivant à partir de *A. centrale* est décrite. Elle implique l'infection d'un veau splénectomisé réceptif et l'utilisation de son sang comme vaccin. Les étapes détaillées de la procédure de production sont décrites dans la littérature scientifique et nous invitons les lecteurs à s'y référer s'ils souhaitent plus de détails sur les procédures mentionnées ci-après (3, 7, 29).

Des lignes directrices pour la fabrication des vaccins à usage vétérinaire sont données dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ci-dessous et dans le Chapitre 1.1.8. sont volontairement de nature générale et peuvent être complétées par des exigences nationales et régionales.

Le vaccin contre *Anaplasma centrale* peut être obtenu sous sa forme congelée ou réfrigérée selon la demande, le réseau de transport et la disponibilité d'azote liquide ou de carboglace. Le vaccin congelé est recommandé par la plupart des instances, puisqu'il permet le contrôle-qualité de chaque lot après production. Il est toutefois plus cher à produire et plus difficile à transporter que le vaccin réfrigéré. Le risque de contamination fait du contrôle post-production une étape essentielle dont le coût peut être prohibitif.

1. Gestion des semences

a) Caractéristiques de la semence

Anaplasma centrale a été isolé en 1911 en Afrique du Sud et a été utilisé comme vaccin en Amérique du Sud, en Australie, en Afrique, au Moyen Orient et en Asie du Sud Est. Il offre une protection partielle mais adéquate dans des régions où les souches de terrain sont de virulence modérée (par ex. l'Australie) (4). Dans les régions tropicales humides où *A. marginale* est un parasite très virulent, la protection due à *A. centrale* peut ne pas être adéquate pour prévenir la maladie chez certains animaux.

Anaplasma centrale cause généralement des infections bénignes, spécialement si les veaux ont moins de 9 mois. Des réactions graves après la vaccination ont été rapportées quand des bovins adultes sont inoculés.

b) Préparation et stockage

Le matériel infectieux est directement conservé sous forme de stabilisats de sang infecté dans l'azote liquide ou dans de la carboglace. Le DMSO (diméthyl sulphoxide) et la polyvinyl-pyrrolidone M.W. 40 000 (3) sont les cryo-conservateurs recommandés. Ils permettent l'administration intraveineuse après décongélation du stabilisat. Un compte-rendu détaillé de la technique de congélation utilisant le DMSO est donné ailleurs (23), mais brièvement, le sang est collecté, réfrigéré à 4 °C et le cryo-conservateur réfrigéré est ajouté (DMSO 4 M dans du PBS) doucement en remuant à un ratio final sang/cryo-conservateur de 1:1 avec une concentration finale de DMSO de 2 M. La totalité de la procédure est effectuée dans un bain de glace et le sang dilué est réparti dans des récipients adéquats (ex. cryotubes de 5 ml), puis congelé aussi vite que possible dans l'azote liquide.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

La qualité d'un isolat de *A. centrale* en tant que vaccin peut être déterminée en inoculant des bovins sensibles, en évaluant les réactions subséquentes à l'inoculation puis en infectant les animaux et les contrôles avec une souche virulente locale de *A. marginale*. La sécurité et l'efficacité peuvent être jugées en suivant la parasitémie dans des étalements sanguins colorés et en évaluant la dépression du volume des cellules des bovins inoculés pendant la vaccination et la ré-infection. La pureté de l'isolat peut être déterminée en testant des sérums de bovins utilisés dans le test de sécurité vis-à-vis des contaminants qui pourraient être présents (3, 30).

2. Méthode de fabrication

a) Production du vaccin congelé

Le produit congelé (5 à 10 ml) est décongelé par immersion des tubes dans un bain-marie préchauffé à 40 °C. Le matériel décongelé est conservé dans la glace et utilisé dès que possible (dans les 30 min) pour infecter un veau sensible, splénectomisé par inoculation intraveineuse.

La parasitémie du veau donneur est contrôlée chaque jour par examen sur des étalements sanguins et le sang est collecté pour la production de vaccin quand une parasitémie convenable est atteinte. Une parasitémie de 1×10^9 /ml (approximativement 2 % de parasitémie) est le minimum requis pour la production de vaccin. Si une parasitémie convenable n'est pas atteinte, un passage supplémentaire par inoculation de 100 à 200 ml de sang à un second veau splénectomisé peut être nécessaire.

Le sang du donneur est collecté par cannulation à la jugulaire ou à la carotide avec de l'héparine comme anti-coagulant (5 Unités Internationales [UI] d'héparine/ml de sang).

Au laboratoire, le sang parasité est mélangé avec un volume de glycérol 3 M dans du PBS supplémenté avec 5 mM de glucose à 37 °C (concentration finale de glycérol 1,5 M). Le mélange est équilibré à 37 °C pendant 30 min et distribué dans des tubes adéquats (tubes à congélation de 5 ml). Les tubes sont refroidis 10 °C/min dans la phase gazeuse de l'azote liquide et quand ils sont congelés, ils sont stockés dans la phase liquide (3).

Du DMSO peut être utilisé comme cryo-conservateur à la place du glycérol. La procédure est la même que celle décrite pour la préparation du stabilisat (23, 28).

Si le vaccin glycérolé doit être dilué, le diluant utilisé est du PBS contenant 1,5 M de glycérol et 5 mM de glucose (14). Le vaccin dans du DMSO doit être dilué dans une solution contenant la même concentration de DMSO (31).

b) Production de vaccin réfrigéré

Le matériel infectieux pour le vaccin réfrigéré est préparé de la même manière que pour le vaccin congelé, mais il doit être utilisé dès que possible après collecte. Le sang infectieux peut être dilué pour avoir 1×10^7 parasites par dose de vaccin. Un diluant adéquat est le sérum de bœuf stérile à 10 % dans une solution de glucose tamponnée contenant par litre : NaCl (7,00 g), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,34 g), glucose (1,00 g), Na_2HPO_4 (2,52 g), KH_2PO_4 (0,90 g), et $NaHCO_3$ (0,52 g).

Si le diluant n'est pas disponible, l'acide citrate dextrose (20 % v/v) ou du phosphate dextrose citrate (20 % v/v) doit être utilisé comme anti-coagulant pour fournir le glucose nécessaire à la survie des organismes.

c) Utilisation du vaccin

Dans le cas du vaccin congelé, les tubes doivent être décongelés par immersion dans un bain-marie préchauffé entre 37 °C et 40 °C et le contenu doit être mélangé avec un diluant adéquat pour avoir la dilution requise. Si le vaccin est glycérolé, il doit être conservé au froid et utilisé dans les 8 h (3). Si le DMSO est le cryo-conservateur, le vaccin doit être conservé dans la glace et utilisé dans les 15 à 30 min (28). Le vaccin est le plus souvent administré par voie sous-cutanée.

Le vaccin réfrigéré doit être conservé au froid et utilisé dans les 4 à 7 jours suivant sa préparation.

La souche de *A. centrale* utilisée dans les vaccins est de virulence réduite, mais n'est pas totalement sans danger. De ce fait, une recommandation pratique est de limiter l'utilisation du vaccin à des veaux, pour lesquels une immunité non spécifique diminuera le risque de la réaction au vaccin. Quand des animaux plus vieux sont vaccinés, il existe un risque de réactions graves. Ces réactions sont très rares mais les reproducteurs précieux ou les femelles gestantes réclament une attention particulière et doivent être sous observation quotidienne pendant 3 semaines après la vaccination. Les animaux cliniquement malades doivent être traités à l'oxytétracycline ou l'imidocarb à des doses recommandées par le fabricant.

L'immunité protectrice se développe généralement entre 6 et 8 semaines et dure généralement plusieurs années.

Les vaccins contre l'anaplasmose et la babésiose sont souvent utilisés en même temps, mais il n'est pas conseillé d'utiliser d'autres vaccins en même temps (3).

3. Contrôles en cours de fabrication

a) Source et maintien des donneurs de vaccin

Une source de veaux exempts d'infections naturelles d'*Anaplasma* ou d'autres maladies transmises par les tiques doit être identifiée. Si une source adéquate n'est pas disponible, il peut être nécessaire de croiser des veaux dans des conditions où l'absence de tiques est contrôlée, spécialement dans le but de la production d'un vaccin.

Les veaux doivent être maintenus dans des conditions empêchant l'exposition à des maladies infectieuses et à des tiques ou des insectes piqueurs. En absence de telles conditions, le risque de contaminations avec des agents de maladies infectieuses présents dans le pays doit être estimé, et le bénéfice de la production locale du vaccin évalué vis-à-vis des conséquences possibles de diffusion de la maladie (3).

b) Chirurgie

Les veaux donneurs doivent être splénectomisés pour permettre la production maximale de vaccin. Cela est effectué sous anesthésie générale chez de jeunes veaux.

c) Criblage des donneurs avant inoculation

Les veaux donneurs doivent être examinés pour tous les agents infectieux transmis par le sang présents dans le pays producteur du vaccin, parmi lesquels *Babesia*, *Anaplasma*, *Cowdria*, *Theileria* et *Trypanosoma*. Cela peut être effectué par examen de routine d'étalement sanguin après splénectomie et par sérologie. Tout veau ayant des signes d'infections naturelles devra être éliminé. L'absence d'autres agents infectieux doit également être confirmée. Il s'agit des agents de la leucose bovine enzootique, de la maladie des muqueuses, de la rhinotrachéite infectieuse bovine, de la fièvre des trois jours, de la maladie d'Akabane, de la bluetongue, de la fièvre aphteuse et de la peste bovine. Les protocoles dépendent des maladies présentes dans le pays et de la disponibilité des tests, mais ils doivent comporter au moins, des épreuves sérologiques sur des paires de sérums et dans certains cas, l'isolement du virus, la détection des antigènes ou de l'ARN/ADN (3, 28, 30).

d) Suivi de la parasitémie après inoculation

Il est nécessaire de déterminer les concentrations de parasites dans le sang collecté pour la vaccination. La concentration parasitaire peut être établie à partir du comptage des érythrocytes et de la parasitémie (pourcentage des érythrocytes infectés).

e) Collecte de sang pour la vaccination

Tout le matériel doit être stérilisé avant utilisation (par autoclavage). Une fois que la parasitémie requise est atteinte, le sang est collecté sur de l'héparine dans des conditions d'asepsie stricte. Il est préférable de donner un sédatif au veau avant prélèvement et d'utiliser un circuit fermé de collecte.

On peut prélever jusqu'à 3 litres de sang hautement infecté à partir d'un veau de 6 mois. Si le veau doit rester en vie, il est indiqué de transfuser l'animal avec la même quantité de sang provenant d'un donneur adéquat. Autrement, le veau doit être tué immédiatement après la collecte de sang.

f) Distribution du vaccin

Toutes les procédures doivent être réalisées dans un environnement adéquat, comme par exemple une hotte à flux laminaire, en manipulant stérilement. L'utilisation d'un mélangeur magnétique ou mécanique assurera un bon mélange du sang et de son diluant pendant la phase de distribution.

4. Contrôle des lots

L'efficacité, la sécurité et la stérilité des lots de vaccin ne peuvent être déterminées dans le cas de vaccins réfrigérés, et les recommandations pour le vaccin congelé dépendent du pays impliqué. Ce qui suit concerne les recommandations pour la production de vaccin congelé en Australie.

a) Stérilité et absence de contaminants

Des tests de stérilité normalisés sont utilisés pour chaque lot de vaccin et de diluant (voir Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »).

L'absence de contaminants est confirmée en réalisant des tests sérologique appropriés sur le bovin donneur, en inoculant des lymphocytes du donneur à des moutons qui sont alors suivis pour mettre en évidence une infection virale, et en inoculant des bovins et en détectant par des épreuves sérologiques la

présence d'agents infectieux qui peuvent contaminer potentiellement le vaccin. Les bovins inoculés pendant le test d'activité (voir section C.4.c) peuvent également servir pour ce test. Selon le pays d'origine du vaccin, les agents recherchés sont ceux de la leucose bovine enzootique, la rhinotrachéite bovine infectieuse, la maladie des muqueuses, la fièvre des trois jours, la maladie d'Akabane, le virus Aino, la bluetongue, le virus parainfluenza, la fièvre aphteuse, la dermatose nodulaire contagieuse, la rage, la fièvre de la Vallée du Rift, la peste bovine, la péripneumonie contagieuse bovine, la maladie de Jembrana, la cowdriose, les espèces pathogènes de *Theileria* et *Trypanosoma* spp., *Brucella abortus*, *Coxiella* et *Leptospira* (3, 28, 30).

b) Innocuité

Les réactions au vaccin des bovins inoculés dans le test d'activité (voir Section C.4.c.) sont suivies en mesurant la parasitémie et la diminution du volume sanguin. Seuls les lots avec des niveaux de pouvoir pathogène égaux ou inférieurs à une norme prédéterminée sont utilisés.

c) Activité

Le vaccin est décongelé et dilué au 1/50 avec un diluant adéquat (3). Le vaccin dilué est incubé pendant 8 h à 4 °C et 5 bovins sont inoculés par voie sous-cutanée avec des doses de 2 ml. Les bovins inoculés sont suivis pour évaluer l'infection par examens d'étalement de sang. Tous les bovins doivent être infectés pour un lot pour que ce lot soit accepté. Un lot infectieux au 1/50 est recommandé pour l'utilisation au 1/5 avec un diluant isotonique.

d) Durée de l'immunité

Une immunité partielle mais de longue durée résulte d'une seule inoculation. Il n'y a aucune preuve d'un effet accru dû à la répétition de la vaccination.

e) Stabilité

Le vaccin peut être conservé pendant 5 ans quand il y est stocké dans de l'azote liquide. Une fois décongelé, il perd rapidement son efficacité. Un vaccin décongelé ne peut être recongelé.

f) Agents de conservation

Aucun agent de conservation n'est ajouté. De la pénicilline (500 000 UI/litre) et de la streptomycine (370 000 µg/litre) sont ajoutées au vaccin au moment de sa distribution.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Le vaccin est non infectieux pour les hommes. Quand le produit est conservé dans de l'azote liquide, les précautions d'usage sont celles concernant le stockage, le transport, la manipulation de produits hautement congelés.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir Section C.4.b.

b) Activité

Voir Section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AMERAULT T.E. & ROBY T.O. (1968). A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **153**, 1828–1834.
2. AMERAULT T.E., ROSE J.E. & ROBY T.O. (1972). Modified card agglutination test for bovine anaplasmosis: evaluation with serum and plasma from experimental and natural cases of anaplasmosis. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, **76**, 736–744.
3. BOCK R., JACKSON L., DE VOS A. & JORGENSEN W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, **129**, Suppl, S247–269.

4. BOCK R. E. & DE VOS A.J. (2001). Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust. Vet. J.*, **79**, 832–839.
5. BRADWAY D.S., TORIONI DE ECHAIDE S., KNOWLES D.P., HENNAGER S.G., & McELWAIN T.F. (2001). Sensitivity and specificity of the complement fixation test for detection of cattle persistently infected with *Anaplasma marginale*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 79–81.
6. COETZEE J.F., SCHMIDT P.L., APLEY M.D., REINBOLD J.B. & KOCAN K.M. (2007). Comparison of the complement fixation test and competitive ELISA for serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infection in experimentally infected steers. *Am. J. Vet. Res.*, **68**, 872–878.
7. DE VOS A.J. & JORGENSEN W.K. (1992). Protection of cattle against babesiosis in tropical and subtropical countries with a live, frozen vaccine. In: Tick Vector Biology, Medical and Veterinary Aspects, Fivaz B.H., Petney T.N. & Horak I.G., eds. Springer Verlag, Berlin, Germany, 159–174.
8. DREHER U.M., DE LA FUENTE J., HOFMANN-LEHMANN R., MELI M.K., PUSTERIA N., KOCAN K.M., WOLDEHIWET A., REGULA G. & STAERK K.D.C. (2005). Serologic cross reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 1177–1183.
9. 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 five 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.
10. DUZGUN A., SCHUNTER C.A., WRIGHT I.G., LEATCH G. & WALTISBUHL D.J. (1988). A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infections. *Vet. Parasitol.*, **29**, 1–7.
11. FIGUEROA J.V., CHIEVES L.P., JOHNSON G.S. & BUENING G.M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol.*, **50**, 69–81.
12. GALE K.R., DIMMOCK C.M., GARTSIDE M. & LEATCH G. (1996). *Anaplasma marginale*: Detection of carrier cattle by PCR-ELISA. *Int. J. Parasitol.*, **26**, 1103–1109.
13. GE N.-L., KOCAN K.M., EWING S.A., BLOUIN E.F., EDWARDS W.W., MURPHY G.L. & DAWSON L.J. (1997). Use of a non-radioactive DNA probe for detection of *Anaplasma marginale* infection in field cattle: comparison with complement fixation serology and microscopic examination. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 39–43.
14. JORGENSEN W.K., DE VOS A.J. & DALGLIESH R.J. (1989). Infectivity of cryopreserved *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma centrale* for cattle after thawing, dilution and incubation at 30°C. *Vet. Parasitol.*, **31**, 243–251.
15. KOCAN K.M., DE LA FUENTE J., BLOUIN E.F. & GARCIA-GARCIA J.C. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, **129**, S285–S300.
16. KOCAN K.M., DE LA FUENTE J., GUGLIELMONE A.A. & MELENDEZ R.D. (2003). Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.*, **16**, 698–712.
17. KOCAN K.M., GOFF W.L., STILLER D., CLAYPOOL P.L., EDWARDS W., EWING S.A., HAIR J.A. & BARRON S.J. (1992). Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible cattle. *J. Med. Ent.*, **29**, 657–668.
18. KNOWLES D., TORIONI DE ECHAIDE S., PALMER G., MCGUIRE T., STILLER D. & McELWAIN T. (1996). Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2225–2230.
19. KREIER J.P. & RISTIC M. (1963). Anaplasmosis. X Morphological characteristics of the parasites present in the blood of calves infected with the Oregon strain of *Anaplasma marginale*. *Am. J. Vet. Res.*, **24**, 676–687.
20. HOFMANN-LEHMANN R., MELI M.L., DREHER U.M., GÖNCZI E., DEPLAZES P., BRAUN U., ENGELS M., SCHÜPBACH J., JÖRGER K., THOMA R., GRIOT C., STÄRK K.D.C., WILLI B., SCHMIDT J., KOCAN K.M. & LUTZ H. (2004). Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal haemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 3775–3780.

21. MARCHETTE N. & STILLER D. (1982). Chapter 11: The Anaplasmataceae, Bartonellaceae, and *Rochalimaea quintana*. In: Ecological Relationships and Evolution in the Rickettsiae, Vol. 11, Marchette N.J., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 98–106.
22. MCHARDY N. (1984). Immunization against anaplasmosis: a review. *Prev. Vet. Med.*, **2**, 135–146.
23. MELLORS L.T., DALGLIESH R.J., TIMMS P., RODWELL B.J. & CALLOW L.L. (1982). Preparation and laboratory testing of a frozen vaccine containing *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma centrale*. *Res. Vet. Sci.*, **32**, 194–197.
24. MOLLOY J.B., BOWLES P.M., KNOWLES D.P., MCELWAIN T.F., BOCK R.E., KINGSTON T.G., BLIGHT G.W. & DALGLIESH R.J. (1999). Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. *Aust. Vet. J.*, **77**, 245–249.
25. MONTENEGRO-JAMES S., GUILLEN A.T., MA S.-J., TAPANG P., ABDEL-GAWAD A., TORI M. & RISTIC M. (1990). Use of the dot enzyme-linked immunosorbent assay with isolated *Anaplasma marginale* initial bodies for serodiagnosis of anaplasmosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **51**, 1518–1521.
26. MONTENEGRO-JAMES S., JAMES M.A. & RISTIC M. (1985). Modified indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infections in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 2401–2403.
27. NDUNG’U L.W., AGUIRRE C., RURANGIRWA F.R., MCELWAIN T.F., MCGUIRE T.C., KNOWLES D.P. & PALMER G.H. (1995). Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 675–679.
28. PIPANO E. (1981). Frozen vaccine against tick fevers of cattle. In: XI International Congress on Diseases of Cattle, Haifa, Israel. Mayer E., ed. Bregman Press, Haifa, Israel, 678–681.
29. PIPANO E. (1995). Live vaccines against hemoparasitic diseases in livestock. *Vet. Parasitol.*, **57**, 213–231.
30. PIPANO E. (1997). Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Trop. Anim. Health Prod.*, **29** (Suppl. 4), 86S–90S.
31. PIPANO E., KRIGEL Y., FRANK M., MARKOVICS A. & MAYER E. (1986). Frozen *Anaplasma centrale* vaccine against anaplasmosis in cattle. *Br. Vet. J.*, **142**, 553–556.
32. REYNA-BELLO A., CLOECKAERT A., VIZCAINO N., GONZATTI M.I., ASO P.M., DUBRAY G. & ZYGMUNT M.S. (1998). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **5**, 259–262.
33. RISTIC M. (1968). Chapter 23: Anaplasmosis. In: Infectious Blood Diseases of Man and Animals, Vol. 11, Weinman D. & Ristic M., eds. Academic Press, New York, USA, 473–542.
34. RISTIC M., SIBINOVIC S. & WELTER C.J. (1968). An attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. *Proc. 72nd Meeting of the USA Livestock Sanitary Assoc.*, 56–69.
35. STRIK N.I., ALLEMAN A.R., BARBET A.F., SORENSON H.L., WANSLEY H.L., GASCHEN F.P., LUCKSCHANDER N., WONG S., CHU F., FOLEY J.E., BJOERSDORFF A., STUEN S. & KNOWLES D.P. (2007). Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein 5 and the extent of its cross-reactivity with *A. marginale*. *Clin. Vaccine Immunol.*, **14**, 262–268.
36. TORIONI DE ECHAIDE 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.
37. VISSER E.S., MCGUIRE T.C., PALMER G.H., DAVIS W.C., SHKAP V., PIPANO E. & KNOWLES D.P. (1992). The *Anaplasma marginale* msp 5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect. Immun.*, **60**, 5139–5144.

*
* *

CHAPITRE 2.4.2.

BABÉSIOSE BOVINE

RÉSUMÉ

La babésiose bovine est une maladie transmise par les tiques aux bovins, due à un protozoaire, Babesia bovis, B. bigemina, B. divergens et d'autres espèces. Boophilus spp., le vecteur principal de B. bovis et B. bigemina, sont présents dans les pays tropicaux et subtropicaux. Le vecteur principal de B. divergens est Ixodes ricinus. Il existe d'autres vecteurs importants comme Haemaphysalis et Rhipicephalus spp.

Identification de l'agent pathogène : la présence du parasite dans les animaux morts peut être mise en évidence par des examens en microscopie de frottis sanguins ou de calques de cerveau, rein, foie, et rate, tant que la décomposition n'est pas avancée. Les étalements sont fixés dans du méthanol, colorés avec 10 % de Giemsa pendant 20 à 30 min et examinés à un grossissement de 800 à 1 000 fois sous huile à immersion. Dans le cas d'animaux vivants, des films fins ou épais de sang peuvent être prélevés de capillaires par exemple au bout de la queue. Des épreuves sensibles d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) permettent de détecter et de différencier les espèces de Babesia chez les bovins.

Épreuves sérologiques : l'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) est la plus couramment employée pour la détection d'anticorps anti-B. bovis et B. divergens, mais la méthode immuno-enzymatique (ELISA) est de plus en plus utilisée. L'épreuve d'IFI est utilisée pour la détection d'anticorps anti-B. bigemina, mais des réactions croisées rendent difficile le diagnostic de l'espèce. La réaction de fixation du complément a aussi été utilisée pour la détection des anticorps dirigés contre B. bovis et B. bigemina.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : des vaccins vivants ou atténués de souches de B. bovis, B. bigemina ou B. divergens sont produits dans plusieurs pays à partir de sang d'animaux donneurs infectés. Les vaccins sont disponibles sous formes congelées ou refroidies. La production de vaccin congelé est habituellement recommandée parce qu'elle permet le contrôle tout au long de la phase de post-production de chaque lot. Le risque de contamination de ce vaccin dérivé de sang rend le contrôle qualité essentiel mais qui peut être très coûteux.

Les vaccins utilisant des Babesia vivantes ne sont pas entièrement sûrs. Une recommandation pratique est de limiter leur utilisation aux veaux, de préférence âgés de moins d'un an, quand l'immunité non-spécifique minimisera les risques de réaction à la vaccination. Quand des animaux plus vieux doivent être vaccinés, le risque de réactions doit être surveillé et un traitement à l'aide d'un babesiacide doit être administré si besoin est.

L'immunité protectrice se développe en 3 à 4 semaines et dure pour plusieurs années après une vaccination unique.

A. INTRODUCTION

La babésiose bovine est due à des parasites protozoaires du genre *Babesia*, de l'ordre des *Piroplasmida*, du phylum des *Apicomplexa*. Parmi les espèces infectant les bovins, deux (*Babesia bovis* et *B. bigemina*) sont réparties dans le monde entier avec une importance majeure en Afrique, Asie, Australie et Amérique centrale et du Sud. *Babesia divergens* est économiquement importante dans certaines parties d'Europe.

Les vecteurs de la *Babesia* sont des tiques (18). *Boophilus microplus* est le vecteur principal de *B. bigemina* et *B. bovis* et est présent dans les pays tropicaux et subtropicaux. Le vecteur de *B. divergens* est *Ixodes ricinus*. Les autres vecteurs importants sont *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus* et d'autres *Boophilus* spp.

Babesia bigemina a la répartition la plus étendue, mais en général, *B. bovis* est plus pathogène que *B. bigemina* ou *B. divergens*. Les infections sont caractérisées par une forte fièvre, une ataxie, une anorexie, un syndrome de choc circulatoire et parfois des signes nerveux en raison de la séquestration des érythrocytes infectés dans les capillaires cérébraux. Dans la phase aiguë, la parasitémie maximum (pourcentage d'érythrocytes infectés) dans le sang circulant est inférieure à 1 %. Ce n'est pas le cas pour les infections à *B. bigemina*, où la parasitémie peut être supérieure à 10 % et peut même atteindre 30 %. Dans les infections à *B. bigemina*, les signes cliniques majeurs sont la fièvre, une hémoglobinurie et une anémie. La séquestration intravasculaire d'érythrocytes infectés n'a pas lieu dans les infections à *B. bigemina*. La parasitémie et l'apparence clinique de l'infection à *B. divergens* sont similaires à l'infection due à *B. bigemina* (41).

Les animaux infectés développent une immunité de longue durée contre la réinfection avec la même espèce de parasite. Des degrés de protection croisée d'animaux immuns pour *B. bigemina* contre une infection suivante par *B. bovis* existent. Les veaux présentent rarement de signes clinique de la maladie après infection quelque soit l'espèce de *Babesia* en cause ou le statut immunologique de la mère (4, 10).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

La méthode traditionnelle d'identification de l'agent dans des animaux infectés se fait par l'examen microscopique d'étalement de sang coloré, par exemple par du Giemsa. La sensibilité de cette technique est telle qu'elle permet de détecter des parasitémie aussi faible que 1 parasite pour 10^6 globules rouges (8). La différenciation entre espèces est bonne pour des étalements fins, mais est moins bonne pour les étalements épais. Cette technique est habituellement adaptée à la détection dans le cas d'infections aiguës, mais pas pour la détection de porteurs pour lesquels la parasitémie est en général faible. L'identification du parasite et de l'espèce peut être améliorée en utilisant une coloration fluorescente, comme l'acridine orange plutôt que le Giemsa (8). Une méthode quantitative sur la fraction leucocytaire a été développée qui colore à l'acridine orange les parasites dans des tubes capillaires pour mettre en évidence la présence de *Plasmodium* dans du sang humain et elle pourrait être aussi utilisée pour détecter *Babesia* dans le cas de parasitémie faible, mais la différenciation de l'espèce restera probablement difficile (8).

Les échantillons provenant d'animaux vivants doivent être prélevés à partir de capillaires, comme ceux du bout de l'oreille ou de la queue, puisque *B. bovis* est plus fréquente dans les capillaires sanguins. *Babesia bigemina* et *B. divergens* sont uniformément distribués dans tous les vaisseaux sanguins. S'il n'est pas possible d'obtenir des gouttes de sang frais à partir de sang capillaire, du sang stérile provenant de la jugulaire peut être collecté avec un anticoagulant comme l'EDTA (acide tétra-acétique éthylène diamine) à 1 mg/ml. L'héparine peut altérer la couleur caractéristique du marquage et n'est donc pas recommandée. Les échantillons doivent être conservés au frais, de préférence à 5 °C, jusqu'à ce qu'ils soient livrés au laboratoire, de préférence quelques heures après leur collecte. Les étalements fins de sang sont séchés à l'air, fixés dans du méthanol absolu pendant 1 min, et colorés dans une solution de Giemsa à 10 % pendant 20 à 30 min. Il est préférable de les colorer juste après les avoir préparés afin d'obtenir une bonne définition de la coloration. Les étalements épais sont réalisés en plaçant une petite goutte (approximativement 50 µl) de sang sur une lame propre. La goutte est alors séchée à l'air, fixée à la chaleur à 80 °C pendant 5 min et colorée dans une solution de Giemsa à 10 % pendant 15 à 20 min. Les étalements de sang non colorés ne doivent pas être stockés avec des solutions de formol qui peuvent altérer la qualité de la coloration.

Les échantillons provenant d'animaux morts sont de fins étalements de sang, ou des étalements à partir, par ordre de préférence, du cortex cérébral, de rein, de foie, de rate et de moelle osseuse. Les étalements d'organe sont réalisés en pressant une lame propre sur une surface de l'organe fraîchement sectionné ou en écrasant un petit morceau de tissu entre deux lames de microscopes de telle sorte qu'un film de tissu soit présent sur chaque lame. L'étalement est alors séché à l'air (en le réchauffant un peu, dans les climats humides), fixé pendant 5 min dans du méthanol absolu et coloré pendant 20 à 30 min dans une solution de Giemsa à 10 %. Cette méthode est utilisée pour le diagnostic des infections à *B. bovis* mais n'est pas valable si les échantillons sont prélevés 24 h ou plus après la mort de l'animal. Cependant les parasites peuvent souvent être détectés dans le sang veineux prélevé dans la région des membres un ou plusieurs jours suivant la mort.

Tous les étalements colorés sont examinés sous huile à immersion en utilisant un oculaire ×8 et un objectif ×60. *Babesia bovis* est un petit parasite, habituellement localisé au centre de l'érythrocyte. Il mesure approximativement entre 1 et 1,5 µm de long, 0,5 et 1,0 µm de large et est souvent rencontré par paires situés en angle obtus l'un par rapport à l'autre. *Babesia divergens* est aussi un petit parasite, de morphologie similaire à

B. bovis. Cependant, les paires en angle obtus sont localisées au bord de l'érythrocyte. *Babesia bigemina* est beaucoup plus long et est rencontré par paires à angle aigu l'un par rapport à l'autre. *Babesia bigemina* a typiquement une forme de poire, mais de nombreuses formes uniques sont rencontrées. Il mesure de 3 à 3,5 µm de long et 1 à 1,5 µm de large et les formes par paire ont souvent 2 points rouges discrets dans chaque parasite (*B. bovis* et *B. divergens* n'en ont qu'un). Dans les cas aigus, la parasitémie à *B. bovis* seul peut atteindre 1 % mais avec *B. bigemina* et *B. divergens* des taux de parasitémie plus élevés sont la norme. Des films de sang épais sont particulièrement utiles pour le diagnostic d'infections à *B. bovis* à bas niveau, tout comme le sont les étalements à partir d'organes (2).

Des réactions d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) se sont révélées très sensibles particulièrement pour la détection de *B. bovis* et *B. bigemina* chez les bovins (9, 11, 17, 34, 36, 38). Thammasirak *et al.* ont trouvé que leur PCR - épreuve immuno-enzymatique (ELISA) était au moins 1 000 fois plus sensible que les étalements fins de sang pour détecter *B. bovis* (38). Des niveaux de détection aussi faibles que 3 érythrocytes parasités dans 20 µl ont été annoncés (37). Un certain nombre de techniques de PCR permettant la détection et la différenciation des espèces de *Babesia* dans des infections ont été décrites (9, 11, 17, 36). Des épreuves de PCR permettant de différencier les isolats de *B. bovis* ont été décrites (6). L'adaptation aux *Babesia* d'une technique d'hybridation des produits de la PCR à des sondes oligonucléotidiques spécifiques d'espèce (21) ont permis la détection simultanée de plusieurs espèces même dans les cas de porteurs chroniques. Cependant, les épreuves de PCR actuelles ne sont pas adaptées à des tests à grande échelle et ne sont pas prêtes pour le moment de remplacer les épreuves sérologiques comme méthode de choix pour les études épidémiologiques. Les épreuves de PCR sont utiles comme épreuves de confirmation et dans certains cas pour des épreuves édictées par la réglementation.

Les méthodes de culture *in vitro* ont été utilisées pour prouver la présence de *Babesia* spp. dans des cas d'infections (22) et *B. bovis* a été clonée en culture. La parasitémie minimum détectable par cette méthode dépendra, des équipements disponibles et de l'habileté de l'opérateur (8) mais peut être aussi faible que 10^{-10} (19), ce qui en fait une méthode très sensible pour prouver l'infection. Un atout est sa spécificité de 100 %.

La confirmation de l'infection chez un animal suspect peut aussi être réalisée par transfusion d'approximativement 500 ml de sang de la jugulaire à un veau splénectomisé, exempt de *Babesia* ; le veau est alors suivi pour la détection de l'infection. Cette méthode est lourde et chère et évidemment pas applicable à un diagnostic de routine. Des gerbilles de Mongolie (*Meriones unguiculatus*) peuvent cependant être utilisées pour mettre en évidence la présence de *B. divergens* (41).

2. Épreuves sérologiques

L'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) est largement utilisée pour détecter les anticorps de *Babesia* spp. Mais l'épreuve pour *B. bigemina* est très peu spécifique. Des réactions croisées avec les anticorps anti-*B. bovis* dans l'épreuve contre *B. bigemina* sont un problème particulier dans les régions où les 2 espèces coexistent. L'épreuve d'IFI a le désavantage de ne pouvoir être réalisée que sur un faible nombre d'échantillons et de la subjectivité de sa lecture. La réaction de fixation du complément (FC) a été décrite comme une technique de détection des anticorps dirigés contre *B. bovis* et *B. bigemina* (1). Cette réaction a été utilisée pour contrôler les animaux en vue d'importation dans certains pays. Elle est basée sur le protocole décrit et validé précédemment pour la détection des anticorps anti-*Babesia caballi* et anti-*Theileria equi* (voir le Chapitre 2.5.8., Piroplasmose équine). Un test ELISA pour le diagnostic des infections dues à *B. bovis* utilisant un antigène constitué par des mérozoïtes complets a subi une très longue évaluation (12, 29, 39). Des ELISA de compétition utilisant une association d'antigènes recombinants de surface de mérozoïte et de rhoptrie de *B. bovis* ont été récemment développés (7, 14, 20) mais n'ont pas encore été validés à grande échelle. En dépit des efforts de plusieurs chercheurs dans différents laboratoires, il n'existe toujours pas de test ELISA correctement validé pour *B. bigemina*. Les tests ELISA pour détecter les anticorps dirigés contre *B. bigemina* ont la caractéristique d'être de faible spécificité. Dans une étude (16), un antisérum contre *B. bigemina* réagit de manière non spécifique avec du fibrinogène. À notre connaissance, le seul test ELISA utilisé en routine est un test ELISA de compétition mis au point et validé en Australie (30). En l'absence d'une autre épreuve efficace pour *B. bigemina*, le protocole pour ce test a été introduit ici. Des tests ELISA ont aussi été développés pour *B. divergens* (9) en utilisant de l'antigène dérivé de culture, mais il ne semble pas qu'un test ait été validé internationalement.

a) Méthode immuno-enzymatique pour *Babesia bovis*

La préparation d'antigène est basée sur une technique décrite par Waltisbuhl *et al.* (39). Le sang infecté (habituellement entre 5 et 10 % de parasitémie) est collecté sur EDTA à partir d'un veau splénectomisé. Le sang est lavé 3 fois dans 5 volumes de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) et les cellules infectées sont alors concentrées par lyses différentielles des cellules non infectées dans une solution hypotonique. Les cellules infectées sont plus résistantes à la lyse que les non infectées. Une série de solutions salines hypotoniques de 0,35 à 0,5 % de NaCl avec un pas de 0,025 % sont préparées. Afin de déterminer la meilleure concentration, 5 volumes de chaque solution saline sont ajoutés à un volume de globules rouges qui sont agités légèrement puis déposés pendant 5 min.

Les mélanges sont alors centrifugés et les surnageants sont aspirés. Un volume égal de plasma (provenant du sang originel) est ajouté à chaque tube contenant les globules rouges et le contenu des tubes est alors mixé. De fins étalements sont alors préparés à partir de ces suspensions de cellules sanguines ; ils sont fixés au méthanol et colorés au Giemsa. Ces étalements sont examinés au microscope pour déterminer la concentration de solution saline qui lyse le plus de globules rouges non infectés mais qui laisse intacts les globules rouges infectés. Il peut être possible d'arriver à un taux d'infection supérieur à 95 % dans les globules rouges restant intacts. L'agrégat de globules rouges est alors lysés avec la solution saline optimale et centrifugé. Le culot (contenant plus de 95 % de globules rouges infectés) est lysé dans de l'eau distillée à 4 °C et les parasites sont culottés à 12 000 *g* pendant 30 min. Le culot est lavé 3 fois dans du PBS par re-suspension et centrifugation à 4 °C. Il est alors suspendu dans 1 ou 2 volumes de PBS à 4 °C et soniqué dans des volumes appropriés en utilisant une puissance moyenne pendant 60 à 90 s. Le matériel soniqué est ultracentrifugé (105 000 *g* pendant 60 min à 4 °C) et le surnageant est récupéré. Il est mixé avec un volume égal de glycérol et stocké dans des tubes de 2 à 5 ml à –70 °C. Un stockage de courte durée à –20 °C est possible pour les tubes de travail.

• **Protocole**

- i) 100 µl de l'antigène dilué de 1/400 à 1/1 600 dans un tampon carbonate pH 9,6 est ajouté à chaque puits d'une microplaque de 96 puits en polystyrène. La plaque est recouverte et incubée une nuit à 4 °C.
- ii) L'antigène est éliminé et les puits sont bloqués pendant 2 h à température ambiante par 200 µl d'une solution à 2 % de caséinate de sodium dilué dans le tampon carbonate.
- iii) Après blocage, les puits sont rincés brièvement avec du PBS contenant 0,1 % de Tween 20 (PBST) et 100 µl de sérum de bovin dilué au 1/100 dans le tampon PBST contenant soit 5 % de sérum normal de chevaux ou 5 % de lait en poudre écrémé. Les plaques sont incubées pendant 2 h à température ambiante.
- iv) L'étape de lavage consiste en un bref lavage avec le PBST, suivi de 3 lavages de 5 min avec le même tampon, sous agitation rapide, suivie d'un bref rinçage.
- v) Ensuite, 100 µl d'IgG anti-bovin marquée à la peroxydase et diluée de manière appropriée dans du PBST contenant du sérum de cheval ou du lait écrémé sont ajoutés aux plaques qui sont agitées pendant 30 min à température ambiante (NB : certaines marque de lait écrémé peuvent contenir des immunoglobulines qui peuvent interférer avec le conjugué IgG anti-bovin)
- vi) Les puits sont lavés comme décrits dans l'étape iv et 100 µl de substrat peroxydase (ABTS [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)]) sont ajoutés dans chaque puits. La réaction doit se continuer jusqu'à ce que l'absorbance d'un témoin positif fort inclus sur chaque plaque approche 1. À ce stade, l'absorbance à 414 nm est lue dans un lecteur de microplaques.

Pour contrôler les variations interplaques, un témoin positif et négatif est inclus dans chaque plaque (29). Les sérums à tester sont gradués en fonction du témoin positif. Les résultats ELISA sont exprimés en pourcentage de ce témoin positif (pourcentage de positivité). Les valeurs positive et négative doivent donc être déterminées dans chaque laboratoire en testant autant de témoins positifs et négatifs connus possible.

Chaque lot d'antigène et de conjugué doit être titré en utilisant une répartition en damier. L'enzyme la plus adaptée au meilleur marquage pour le conjugué est la peroxydase de raifort. L'ABTS ou la benzidine de tétraméthyl (TMB) sont des substrats convenables. Avec ce test, il est possible de détecter des anticorps au moins 4 ans après une seule infection. Il y doit y avoir entre 95 et 100 % de réactions positives avec des sérums d'animaux infectés par *B. bovis*, 1 à 2 % de réactions positives avec des sérums négatifs et moins de 2 % de faux positifs avec des sérums d'animaux infectés par *B. bigemina*.

b) Méthode immuno-enzymatique pour *Babesia bigemina*

Le test ELISA est basé sur l'antigène immunodominant de 58 kDa identifié chez un certain nombre de groupes d'isolats de *B. bigemina* provenant d'Australie, d'Amérique Centrale et du Texas, des États-Unis d'Amérique, d'Égypte et du Kenya (30). Un anticorps monoclonal (D6) (Tick Fever Centre, Qld, Australie) dirigé contre cet antigène a été utilisé pour développer un test d'inhibition compétitive par ELISA (30). L'antigène utilisé dans cette épreuve est un peptide de 26 kDa (Tick Fever Centre, Qld, Australie), codé par un fragment de 360 pb du gène p58, exprimé dans *Escherichia coli* et purifié par affinité. Cet antigène peut également être utilisé pour un test ELISA indirect, mais des réactions croisées avec des anticorps contre *B. bovis* peuvent être attendues.

- **Protocole**

- i) L'antigène recombinant de 26 kDa est dilué dans du tampon carbonate à 0,1 M à pH 9,6 à une concentration approximative de 2 µg/ml et 100 µl sont ajoutés à chaque puits d'une microplaque de 96 puits. Les plaques sont incubées une nuit à 4 °C.
- ii) L'excès d'antigène est éliminé et les puits sont alors bloqués pendant 1 h à température ambiante avec 200 µl d'une solution à 2 % de caséinate de sodium dans le tampon carbonate.
- iii) Après un bref rinçage (3 × 200 µl) avec du PBS contenant 0,1 % de Tween 20 (PBST), 100 µl de sérum non dilué sont ajoutés à chaque puits. Les plaques sont incubées 30 min à température ambiante sous agitation lente.
- iv) Les plaques sont alors lavées avec du PBST (5 × 200 µl, chaque lavage est effectué pendant 5 min sous agitation), 100 µl d'anticorps monoclonal D6 marqué à la peroxydase et dilué à une concentration de 0,03 µg/ml dans du PBST contenant 2 % de lait en poudre écrémé sont ajoutés à chaque puits. Les plaques sont incubées à température ambiante pendant 30 min sous agitation lente.
- v) Les plaques sont lavées à nouveau. 100 µl du substrat de la peroxydase TMB sont ajoutés à chaque puits et les plaques sont incubées dans le noir jusqu'à ce que l'absorbance des puits témoins approche 1. À ce stade, la réaction est stoppée par l'addition de 50 µl d'acide sulfurique 1 M et l'absorbance est lue à 450 nm. Les témoins positifs et négatifs doivent être inclus dans chaque plaque.

Le pourcentage d'inhibition (PI) est calculé pour chaque épreuve par rapport au témoin conjugué seul ($PI = 100 - [100 \times \text{absorbance lors de l'épreuve/témoin de l'absorbance du conjugué}]$). Les valeurs seuil doivent être déterminées pour chaque laboratoire en testant autant de sérums positifs et négatifs qu'il est possible.

La spécificité de l'ELISA a été estimée à 97 % et la sensibilité de détection des anticorps issus de bovins expérimentalement infectés est de 95,7 % (30).

c) **Épreuve d'immunofluorescence indirecte**

- **Préparation de l'antigène**

Les lames d'antigène sont préparées à partir de sang pris à la jugulaire, idéalement quand la parasitémie est entre 2 et 5 %.

Le sang est collecté dans un tube contenant un anticoagulant adéquat (citrate de sodium ou EDTA) puis est ensuite lavé au moins 3 fois dans 5 à 10 volumes de PBS pour éliminer les protéines plasmatiques contaminantes et, en particulier, les immunoglobulines de l'hôte. Après les lavages, les globules rouges infectés sont suspendus dans 2 volumes de PBS dans lequel a été ajouté 1 % de sérum albumine bovine (BSA). La BSA est utilisée pour faire adhérer les globules rouges à la lame. De préférence, un film d'une seule épaisseur de sang est fait en plaçant une goutte de sang sur la lame propre qui est ensuite étalée dans une cytocentrifugeuse. Cette procédure rend uniforme les étalements. Alternativement, de fins films de sang peuvent être effectués par la technique conventionnelle (en traînant la goutte de sang avec une autre lame). Les films sont séchés à l'air libre et fixés pendant 5 min dans un four à 80 °C. Les films de sang fixés sont hermétiquement recouverts (avec une feuille d'aluminium ou une feuille brune autocollante) et sont stockés à -70 °C jusqu'à utilisation (conservation maximale de 5 ans).

- **Protocole**

Les sérums à tester et les témoins sont dilués au 1/30 dans du PBS. Les sérums peuvent être utilisés avec ou sans inactivation par la chaleur à 56 °C pendant 30 min. Les lames sont divisées en 8 à 10 sections avec un stylo à huile pour produire des divisions hydrophobes. Pour chaque carré testé, 5 à 10 µl de chaque dilution de sérum sont ajoutés à la micropipette. Les préparations sont ensuite incubées à 37 °C pendant 30 min dans une chambre humide. Pour les témoins, des dilutions de sérums faiblement positifs et négatifs sont utilisées sur chaque lame.

Après l'incubation, les lames sont rincées 1 fois dans du PBS, puis 2 fois 10 min avec du PBS et enfin dans un bain d'eau. Une dilution appropriée de l'anticorps IgG anti-bovin marqué à l'isothiocyanate fluorescéine (commerciallement disponible) est alors ajoutée dans chaque carré à tester. Chaque nouveau lot de conjugué doit être titré, les gammes de travail sont en général entre 1/400 et 1/1 200. Les anticorps conjugués de lapin et de poulet sont habituellement plus appropriés pour cette étude que les anticorps de chèvre. Les lames avec le conjugué sont incubées à température ambiante pendant 30 min puis lavées comme décrit. Les lames sèches sont montées avec des lamelles dans un mélange de Glycérol/PBS 1/1 et

examinées en microscopie fluorescente standard. Un opérateur compétent peut examiner approximativement 150 échantillons par jour.

d) Réaction de fixation du complément

La réaction de fixation du complément (FC) a été utilisée par certains pays pour le diagnostic en général et pour contrôler les bovins à fin d'importation. Une courte description de la production d'antigène et du protocole utilisé par le Ministère de l'Agriculture des États-Unis est donnée ci-dessous (1). Les techniques sont globalement les mêmes que celles décrites dans ce *Manuel terrestre* pour la FC de microtitrage pour la piroplasmose équine.

• Solutions

Solution d'Alsever : préparer 1 litre de solution d'Alsever par dissolution de 20,5 g de glucose ; 8 g de citrate de sodium ; 4,2 g de chlorure de sodium dans de l'eau distillée en quantité suffisante. Ajuster à pH 6.1 avec de l'acide citrique et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée. Stériliser par filtration.

Tampon véronal concentré (5×) : dissoudre dans 1 litre d'eau distillée les produits suivants : 85 g de chlorure de sodium ; 3,75 g de 5,5 diéthyl barbiturique sodium ; 1,68 g de chlorure de magnésium ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ; 0,28 g de chlorure de calcium. Dissoudre 5,75 g d'acide 5,5 diéthyl barbiturique dans 0,5 litre d'eau distillée chaude (près du point d'ébullition). Refroidir cette solution acide et ajouter à la solution saline. Compléter à 2 litres avec de l'eau distillée et conserver à 4 °C. Pour préparer une solution de travail, mélanger, 1 partie de la solution concentrée à 4 parties d'eau distillée. Le pH final doit être compris entre 7,4 et 7,6.

• Production d'antigène

Le sang est obtenu à partir d'un bovin présentant une forte parasitémie (à savoir 30 % de parasitémie pour *B. bovis* et 60 % pour *B. bigemina*), et mélangé avec un volume identique de solution d'Alsever comme anticoagulant. Après déposition des globules rouges au fond du flacon, le mélange plasma/solution d'Alsever surnageant et la fraction leucocytaire sont enlevés. Les globules rouges sont lavés plusieurs fois avec du tampon véronal réfrigéré puis éclatés. L'antigène est récupéré à partir du lysat par centrifugation à 30 900 *g* pendant 30 min.

Après récupération, l'antigène est lavé plusieurs fois dans du tampon véronal par centrifugation à 20 000 *g* pendant 15 min. De la polyvinyl pyrrolidone (5 % p/v) est ajoutée comme stabilisateur et la préparation est mélangée sur un agitateur magnétique pendant 30 min, passée en force à travers 2 épaisseurs de gaze stérile, distribuée sous un volume de 2 ml et lyophilisée. L'antigène peut être conservé à -50 °C pendant plusieurs années.

• Protocole – Méthode de microtitrage

- i) La spécificité et l'efficacité de chaque lot d'antigène doivent être vérifiées contre des anti-sérums de référence de spécificité et efficacité connues. Les dilutions optimales de l'antigène sont déterminées lors d'un titrage préalable en échiquier.
- ii) Les sérums à tester sont inactivés pendant 30 min à 58 °C et testés aux dilutions de 1/5 à 1/320. Toutes les dilutions sont faites dans du tampon véronal.
- iii) Le complément est préparé et titré par spectrophotométrie pour déterminer la dose hémolytique 50 % ($\text{C}'\text{H}_{50}$) et utilisé dans l'épreuve à 5 fois $\text{C}'\text{H}_{50}$. Le système hémolytique (globules rouges sensibilisés) consiste en une suspension, à parts égales, de globules rouges de mouton à 2 % et de tampon véronal avec l'hémolysine à la dilution optimale.
- iv) Le volume total du test est 0,125 ml, composé à parties égales d'antigène (0,025 ml), de complément (5 fois $\text{C}'\text{H}_{50}$) et de sérum dilué. L'incubation est faite à 37 °C pendant 1 h.
- v) Un volume double (0,05 ml) du système hémolytique (globules rouges sensibilisés) est ajouté et les plaques sont incubées pour encore à 45 min à 37 °C ; les plaques sont doucement agitées au bout de 20 min.
- vi) Les plaques sont centrifugées à 300 *g* pendant 5 min avant lecture au dessus d'un miroir.
- vii) La réaction dans chaque puits est enregistrée comme suit : 100 % de lyse = 0 ou négative, 75 % de lyse = 1+, 50 % de lyse = 2+, 25 % de lyse = 3+, 0 % de lyse = 4+. Une réaction de 2+ (50 % de lyse) ou supérieure à la dilution de 1/5 est considérée comme positive ; le résultat de la réaction est donné comme la dilution la plus proche de la plus grande dilution de sérum présentant une réaction 4+ (par ex. : 1+ à la dilution 1:10, pour un échantillon donnant une réaction de 4+ au 1/5 et une réaction de 1+ à la dilution 1/10). Tous les témoins doivent être incorporés dans chaque test, notamment des sérums négatif et positif, ainsi qu'un antigène témoin préparé à partir de globules rouges d'un cheval non infecté.

Les sérums anti-complémentaires sont examinés en utilisant une IFI.

e) Autres épreuves

D'autres épreuves sérologiques ont été décrites récemment et comprennent un ELISA sur membrane (dot ELISA) (31) un ELISA sur lame (25), et des épreuves d'agglutination au latex (3, 26). Ces épreuves présentent des niveaux acceptables de sensibilité et de spécificité pour *B. bovis* et, également pour *B. bigemina* dans le cas de l'ELISA sur membrane. Cependant, aucune de ces épreuves n'a été adoptée pour utilisation lors de diagnostics de routine dans des laboratoires autres que ceux qui les ont développés et validés. L'adaptabilité de ces épreuves au diagnostic de routine est de ce fait inconnue.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Les bovins développent une immunité de longue durée après une première infection par *B. bovis*, *B. divergens* ou *B. bigemina*. Cette caractéristique a été exploitée dans certains pays pour immuniser les bovins contre la babésiose (4, 27, 35). La plupart de ces vaccins vivants contiennent des souches de *Babesia* spécialement sélectionnées, principalement *B. bovis* et *B. bigemina*, et sont produits dans des installations de production supportées par les gouvernements, en tant que service auprès des industries du bétail, en particulier en Australie, Argentine, Afrique du Sud, Israël et l'Uruguay. Un vaccin expérimental contre *B. divergens* préparé à partir de sang infecté de gerbilles a aussi été utilisé avec succès en Irlande (41).

Un vaccin inactivé de *B. divergens* est préparé en Autriche à partir de sang de veaux infectés (15), mais peu d'informations concernant le niveau et la durée de l'immunité sont disponibles. Des vaccins expérimentaux contenant des antigènes produits *in vitro* ont également été développés (3, 32), mais le niveau et la durée de la protection contre une infection hétérologue sont flous. Des protéines parasitaires ont été caractérisées et des progrès ont été faits concernant le développement de sous-unités vaccinales (11, 33). Aucune sous-unité vaccinale n'est encore commercialement disponible.

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 générales et peuvent être modifiées selon les impératifs nationaux ou régionaux.

Cette partie traitera de la production de vaccins vivant contre les babésioses et principalement ceux contre l'infection des bovins avec *B. bovis* et *B. bigemina*. Leur production implique l'infection de veaux avec des souches sélectionnées et l'utilisation de sang comme vaccin (4). Les veaux utilisés pour l'infection avec ces souches doivent être indemnes de tout autre agent infectieux qui pourrait être transmis par les produits dérivés du sang. Dans le cas de *B. divergens*, le sang de gerbilles infectées (*Meriones unguiculatus*) peut être utilisé à la place du sang de bovin. Les méthodes de culture *in vitro* ont également été utilisées pour produire des parasites pour la fabrication de vaccin (24, 27). Cependant le coût relativement élevé de la production à partir de culture et la possibilité de dérive antigénique pendant le maintien en culture, font que la culture en masse de *Babesia* spp. est impraticable dans la plupart des laboratoires.

Les vaccins contre *Babesia bovis* et *B. bigemina* peuvent être préparés sous formes congelée ou réfrigérée selon la demande, les systèmes de transports et la disponibilité en azote liquide ou en carboglace. La préparation de vaccins congelés est préférée (4, 27, 35), car cela permet le contrôle post-production de chaque lot. Cependant, elle est plus coûteuse et le transport est plus difficile que pour les vaccins réfrigérés. Le risque potentiel de contamination de ces vaccins dérivés de sang fait que le contrôle post-production est essentiel, mais le coût de la production peut de ce fait dépasser les moyens financiers de certains pays en zones d'enzootie (13). La création de facilités de production fournissant un marché annuel de moins de 50 000 doses ne peut souvent se faire sans support financier.

1. Gestion des semences

a) Caractéristiques des semences

- Souches disponibles au plan international

Des souches atténuées de *B. bovis* et *B. bigemina* ont été utilisées efficacement pour immuniser des bovins en Afrique, Amérique du Sud et Asie du Sud-Est (4). Des souches transmises ou non par les tiques sont disponibles. Une souche de *B. divergens* à virulence atténuée pour les gerbilles a également été développée (40).

- **Isolation et purification de souches locales**

Des souches de *B. bovis*, *B. divergens* et *B. bigemina* qui sont exemptes de contaminations par des agents tels que *Anaplasma*, *Eperythrozoon*, *Theileria*, *Trypanosoma* et d'autres agents bactériens ou viraux sont isolées le plus rapidement en nourrissant des tiques sur des bovins splénectomisés. Les vecteurs et les modes de transmission de ces espèces sont différents, et ces caractéristiques peuvent être utilisées pour séparer les espèces (19).

Babesia spp. peut également être isolée à partir de bovin infecté par inoculation à des veaux splénectomisés. Un des inconvénients majeurs de cette technique est la difficulté pour séparer les *Babesia* spp. des contaminants tels que *Anaplasma* et *Eperythrozoon*. L'isolement de *B. divergens* est relativement simple du fait de la sensibilité des gerbilles (41). Le maintien *in vitro* des souches isolées (23) peut être utilisé pour éliminer la majorité des contaminants, mais pas pour séparer les espèces de *Babesia* spp. Une chimiothérapie sélective, par exemple 1 % de trypan bleu pour éliminer *B. bigemina*, peut être utilisée pour obtenir *B. bovis* pure à partir d'un mélange, alors que des passages rapides sur des veaux permettront l'isolement de *B. bigemina* (2).

- **Atténuation des souches**

Différents moyens d'atténuation des espèces de *Babesia* spp. ont été décrits. La méthode la plus fiable pour diminuer la virulence de *B. bovis* est basée sur des passages rapides de la souche sur des veaux splénectomisés. L'atténuation n'est pas garantie mais est effective en général après 8 à 20 passages sur veau (4).

La virulence de *B. bigemina* diminue pendant le maintien prolongé du parasite chez des animaux infectés latents. Cette caractéristique a été utilisée pour obtenir des souches avirulentes sur des veaux infectés, en les splénectomisant après 3 mois et ensuite en ré-utilisant les parasites restant selon la même procédure (4).

L'atténuation de *B. divergens* pour les gerbilles est obtenue après maintien *in vitro* sur de longues périodes (40).

L'atténuation des espèces de *Babesia* spp. par irradiation a été essayée mais les résultats sont variables. Semblablement, le maintien *in vitro* dans des milieux modifiés a été utilisé expérimentalement.

Les souches avirulentes doivent être conservées sous forme stable pour les tests d'innocuité et pour l'utilisation future comme inoculum de base pour la production de vaccins.

b) Préparation et conservation des lots de semence primaire

Les souches avirulentes sont conservées sous forme de sang infecté dans de l'azote liquide ou de la carboglace. Le diméthyl sulphoxide (DMSO) et la polyvinyl pyrrolidone MW 40 000 (4) sont les cryoconservateurs recommandés, car ils permettent une administration intraveineuse après décongélation de l'inoculum. Les détails de la technique de congélation dans le DMSO sont décrits ailleurs (28).

Brièvement : le sang est collecté et refroidi à 4 °C. Le cryoconservateur (4 M DMSO dans du PBS) est ajouté en remuant doucement à un rapport final sang/conservateur de 1:1 avec une concentration finale de DMSO de 2 M. Cette procédure est réalisée dans un bain de glace, le sang dilué est distribué dans des tubes appropriés (cryotubes de 5ml) et congelé dès que possible, dans la phase gazeuse d'un container à azote liquide. Les tubes sont stockés dans la phase liquide pour prévenir la perte de viabilité et les contaminations. Congelé selon cette procédure, les lots d'inoculum de base de *Babesia* peuvent être stockés pendant 20 ans.

c) Préparation et conservation du lot de semence de travail

L'inoculum de travail est préparé selon la même procédure que l'inoculum de base (Section C.1.b), l'inoculum de base étant le matériel de départ.

d) Validation de l'innocuité et de l'efficacité du lot de semence de travail

L'utilisation de l'inoculum de travail est déterminée en inoculant un nombre convenable de bovins sensibles avec le vaccin préparé et ensuite en infectant ces bovins avec une souche virulente et une souche hétérologue. L'innocuité et l'efficacité sont déterminées en déterminant la fièvre, la parasitémie sur des frottis sanguins et sur des cellules concentrées. La pureté de l'inoculum de travail est testée en recherchant chez le bovin utilisé pour les tests d'innocuité des contaminants possibles comme mentionné dans la section C.4.b.

2. Méthode de fabrication

a) Production de concentré de vaccin congelé

Premièrement, 5 à 10 ml d'inoculum de travail sont rapidement décongelés par immersion des tubes dans un bain préchauffé à 40 °C. Le matériel décongelé est conservé dans la glace et utilisé dès que possible (dans les 30 min si du DMSO est utilisé) pour infecter un veau sensible, splénectomisé (exempt de contaminant vaccinal potentiel) par inoculation intraveineuse.

Le sang convenant pour la vaccination est récolté par ponction à la jugulaire quand une parasitémie souhaitable est obtenue. Une parasitémie de 1×10^8 /ml (approximativement 2 % de parasitémie dans le sang de la jugulaire) est habituellement adéquat pour la production de vaccins. Si une parasitémie suffisante pour *B. bovis* n'est pas obtenue, le passage de la souche par inoculation de 100 à 800 ml de sang dans un second veau splénectomisé est parfois nécessaire. Le passage de *B. bigemina* n'est pas recommandé.

Le sang du donneur infecté est collecté à la jugulaire en utilisant de l'héparine comme anticoagulant (5 Unité Internationale (UI) d'héparine/ml de sang).

Au laboratoire, le sang parasité est mélangé à un volume de glycérol 3 M dans du PBS supplémenté avec 5 mM de glucose (concentration finale de glycérol, 1,5 M) à 37 °C. Le mélange est équilibré à 37 °C pendant 30 min puis est réparti dans des tubes adéquats (des cryotubes de 5 ml). Les tubes sont refroidis de 10 °C/min dans les vapeurs de l'azote liquide. Quand ils sont congelés, ils sont conservés dans la phase liquide de l'azote liquide (4).

Du DMSO peut être utilisé comme cryopréservateur à la place du glycérol. Le protocole est le même que celui de la préparation de l'inoculum de travail (35).

Si le vaccin congelé glycérolé doit être dilué, le diluant doit être iso-osmotique et consiste en du PBS contenant 1,5 M de glycérol et 5 mM de glucose. De même, le diluant utilisé pour des vaccins cryopréservés dans du DMSO doit être iso-osmotique et doit contenir la même concentration de DMSO dans du PBS.

Les vaccins congelés contenant *B. bovis* et *B. bigemina* peuvent être préparés (27) en mélangeant un nombre égal de parasites obtenus à partir de différents donneurs. Un vaccin trivalent contenant des globules rouges infectés par *B. bovis*, *B. bigemina* et *Anaplasma centrale* est aussi préparé en Australie. Les globules rouges de trois donneurs sont concentrés et mélangés pour produire un concentré trivalent qui est après décongélation est mélangé avec un diluant avant utilisation (4).

La dose de vaccin recommandée après reconstitution varie de 1 à 2 ml selon les pratiques locales et les besoins.

b) Production de vaccin réfrigéré

Le matériel infectieux utilisé dans la production de vaccin réfrigéré est obtenu de la même manière que pour celui du vaccin congelé, mais doit être utilisé dès que possible après collecte. Il est nécessaire d'obtenir le maximum de doses par veau, le matériel infectieux peut être dilué pour avoir le nombre requis de parasites par dose (habituellement entre 2,5 à 10×10^7). Le diluant est 10 % de sérum de bovin stérile dans une solution saline contenant les ingrédients suivant (par litre) : NaCl (7 g), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,34 g), glucose (1 g), Na_2HPO_4 (2,52 g), KH_2PO_4 (0,90 g), et $NaHCO_3$ (0,52 g).

Le sang contenant *B. divergens* doit être dilué dans la solution de Hanks. Si on n'a pas besoin de diluant, du dextrose citrate ou du phosphate dextrose citrate peuvent être utilisés comme anticoagulant, à un ratio de un volume pour 4 volumes de sang afin de donner la quantité de glucose nécessaire à la survie des parasites.

3. Contrôle en cours de fabrication

a) Sources et maintien des donneurs pour la fabrication des vaccins

Une source de donneurs indemnes d'infection naturelle à *Babesia*, d'autres maladies transmises par les tiques et d'autres infections transmises par le sang, doit être identifiée. Si une source convenable n'est pas accessible, il peut être nécessaire d'élever spécifiquement dans ce but des veaux donneurs dans des conditions exemptes de tiques.

Les veaux donneurs doivent être maintenus dans des conditions garantissant la prévention de l'exposition à des maladies infectieuses, des tiques ou des insectes piqueurs. En absence de telles conditions, le risque de contamination par des agents infectieux présents dans le pays impliqué doit être estimé et les bénéfices

d'une production locale de vaccin (opposée à l'importation de produit adéquat) doivent être pesés par rapport aux possibles conséquences de la dissémination de maladies (4).

b) Chirurgie

Les veaux donneurs doivent être splénectomisés pour permettre l'obtention d'une quantité maximale de parasites nécessaires à la production du vaccin. Le mieux est l'utilisation de jeunes veaux de moins de 3 mois sous anesthésie générale.

c) Criblage des donneurs avant inoculation

Les veaux donneurs doivent être examinés pour détecter les agents infectieux transmissibles par le sang et présents dans le pays : *Babesia*, *Anaplasma*, *Theileria*, et *Trypanosoma*. Cela peut être pratiqué par examen de routine sur des étalements sanguins après splénectomie et aussi préférentiellement par des épreuves sérologiques avant et après quarantaine. Les veaux montrant des infections naturelles avec l'un de ces agents doivent être éliminés. L'absence d'autres agents infectieux enzootiques, dans le pays doit également être confirmée ; ces agents incluent les agents de la leucose bovine enzootique, le virus de l'immunodéficience bovine, le pestivirus bovin, la rhinotrachéite bovine infectieuse, la maladie d'Akabane, la fièvre des trois jours, la bluetongue, la fièvre aphteuse et la peste bovine. Les protocoles pour les épreuves dépendront de la prévalence des maladies dans le pays concernés et la disponibilité de ces épreuves, toutefois, elles doivent inclure de la sérologie (sur des paires de sérum) et dans certains cas l'isolement du virus, la détection de l'antigène ou de l'ADN (4, 35).

d) Suivi de la parasitémie après inoculation

Il est nécessaire de déterminer la concentration des parasites dans le sang collecté pour les vaccins. Il existe des techniques pour déterminer le nombre de parasites (2), mais la concentration parasitaire peut être estimée en comptant les globules rouges et la parasitémie (% de globules rouges infectés).

e) Collecte du sang pour les vaccins

Tout le matériel doit être stérilisé avant emploi (par autoclavage par exemple). Le sang est collecté sur héparine dans des conditions d'asepsie strictes quand la parasitémie voulue est obtenue. Il est préférable de donner un sédatif aux veaux (xylazine) et d'utiliser des systèmes courts de collecte du sang.

On peut collecter jusqu'à 3 litres de sang infecté à partir d'un veau de 6 mois. Si le veau doit survivre, il est conseillé de le transfuser avec un volume similaire de sang provenant d'un donneur adéquat. Alternativement, le veau peut être tué immédiatement après la collecte du sang.

f) Répartition du vaccin

Toutes les procédures doivent être effectuées dans un environnement adéquat : sous hotte à flux laminaire, en utilisant des techniques de référence de stérilisation. L'utilisation d'un agitateur mécanique ou magnétique assurera le bon mélange du sang tout le long du processus de fabrication.

4. Contrôle des lots

L'efficacité, l'innocuité, la stérilité des lots de vaccin ne peuvent être déterminées dans le cas des vaccins réfrigérés, et la spécification des vaccins congelés dépend du code de procédure des pays impliqués. Ce qui suit regroupe les spécifications pour la production de vaccin congelé en Australie.

a) Stérilité et absence de contaminants

Les tests de référence de stérilité sont utilisés pour chaque lot de vaccin et de diluant. L'absence de contaminant est déterminée par des épreuves sérologiques appropriées à partir de bovins donneurs et en inoculant des lymphocytes de donneurs à des moutons chez qui l'apparition d'une infection virale est suivie. Les contaminants potentiels incluent les agents de la leucose enzootique bovine, la rhinotrachéite bovine infectieuse, le pestivirus bovin, la fièvre des trois jours, la maladie d'Akabane, le virus Aino, la bluetongue, *Brucella abortus* et *Leptospira*, la fièvre aphteuse, la rage, la fièvre de la vallée du Rift, la peste bovine, la pleuropneumonie contagieuse bovine, la cowdriose, la maladie de Jembrana et les espèces pathogènes de *Theileria* et de *Trypanosoma* (4, 35).

b) Innocuité

Les réactions vaccinales des bovins inoculés dans le test d'activité (voir Section C.4.c) sont surveillées en mesurant la parasitémie, la fièvre et la diminution du volume globulaire. Seuls les lots ayant un pouvoir pathogène égal ou inférieur à une norme prédéterminée sont débloqués pour leur utilisation.

c) Activité

Le concentré de vaccin glycérolé est décongelé et dilué au 1/10 avec le diluant isotonique (4, 35). Le vaccin préparé est alors incubé pendant 8 h à 4 °C et 5 bovins sont inoculés par voie sous-cutanée avec une dose de 2 ml chacun. Les bovins inoculés sont alors examinés pour détecter l'infection par l'examen des frottis sanguins. Seuls les lots hautement infectieux sont conservés pour être utilisés à une dilution de 1/10.

d) Durée de l'immunité

Une inoculation suffit en général pour conférer une immunité de longue durée. Des échecs ont été rapportés avec le vaccin *B. bovis* (4) et sont dus au choix de la souche vaccinale, la présence de souches hétérologues sur le terrain et les facteurs de l'hôte (4). Il y a peu de preuves de chute de l'immunité avec le temps (5).

e) Stabilité

Quand il est stocké dans l'azote liquide, le vaccin peut se conserver pendant 5 ans. Le diluant stérile peut être conservé pendant 2 ans au réfrigérateur. Le vaccin décongelé perd rapidement son efficacité et ne peut pas être recongelé.

f) Agents de conservation

De la pénicilline (500 000 UI/litre) et de la streptomycine (370 000 µg/litre) sont ajoutés au vaccin au moment de sa distribution.

g) Utilisation du vaccin

Dans le cas de vaccins congelés, les tubes doivent être décongelés par immersion dans de l'eau préchauffée à 37-40 °C. Le vaccin glycérolé doit être gardé au froid et utilisé dans les 8 h (4) alors que le vaccin contenant du DMSO doit être conservé sur de la glace pilée et utilisé dans les 15 à 30 min (35).

Le vaccin réfrigéré doit être conservé au réfrigérateur et utilisé dans les 4 à 7 jours après sa préparation, selon la viabilité des parasites.

Les souches de *B. bovis*, *B. divergens* et *B. bigemina* utilisées dans les vaccins doivent avoir une virulence réduite mais ne sont pas complètement sans danger. Il est donc recommandé de limiter la vaccination aux veaux, quand l'immunité non spécifique minimisera les risques des réactions à la vaccination. Si des animaux plus vieux doivent être vaccinés, il existe un risque de réactions sévères. Ces réactions sont peu fréquentes mais les élevages précieux de reproducteurs ou de femelles gestantes doivent être observés avec attention chaque jour pendant 3 semaines après la vaccination. Idéalement, la température rectale des veaux vaccinés doit être prise et les animaux doivent être traités si une fièvre se développe. Les réactions à *B. bigemina* et *B. divergens* apparaissent habituellement entre les jours 6 et 8 et celles à *B. bovis* entre les jours 10 et 16 après la vaccination (4).

Dans la plupart des cas, une immunité protectrice apparaît après 3 à 4 semaines et dure au moins 4 ans (4).

Les vaccins contre la babésiose et l'anaplasmose sont souvent utilisés en même temps mais il n'est pas recommandé d'utiliser d'autres vaccins en même temps (4).

h) Précautions d'emploi et mise en garde

Les vaccins anti-*Babesia bovis* et anti-*B. bigemina* ne sont pas infectieux pour les hommes. Cependant des cas à *B. divergens* ont été rapportés chez des individus splénectomisés. Quand le vaccin est stocké dans l'azote liquide, les précautions d'usage concernant le stockage, le transport, la manutention de matériel congelé, sont appliquées.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir Section C.4.b.

b) Activité

Voir Section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANONYMOUS (2006). Complement fixation test for detection of antibodies to *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* – Microtitration test. United States Department of Agriculture (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.
2. ANONYMOUS (1984). Ticks and Tick-borne Disease Control: A Practical Field Manual. Vol II Tick-borne Disease Control. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome, Italy.
3. BLANDINO T., ALVAREZ M., LARRAMENDI R., GOMEZ E. & ALONSO M. (1991). Elaboracion y evaluacion de un antígeno de *Babesia bovis* para la prueba de aglutination en latex. *Rev. Salud Animal*, **13**, 177–179.
4. BOCK R., JACKSON L., DE VOS A. & JORGENSEN W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, **129** Suppl, S247–269.
5. BOCK R.E. & DE VOS A.J. (2001). Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust. Vet. J.*, **79**, 832–839.
6. BOCK R.E., LEW A.E., MINCHIN C.M., JESTON P.J. & JORGENSEN W.K. (2000). Application of PCR assays to determine the genotype of *Babesia bovis* parasites isolated from cattle with clinical babesiosis soon after vaccination against tick fever. *Aust. Vet. J.*, **78**, 179–181.
7. BOONCHIT S., XUAN X., YOKOYAMA N., GOFF W.L., WAGHELA S.D., WAGNER G. & IGARASHI I. (2004). Improved enzyme-linked immunosorbent assay using C-terminal truncated recombinant antigens of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein-1 for detection of specific antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1601–1604.
8. BOSE R., JORGENSEN W.K., DALGLIESH R.J., FRIENDHOFF K.T. & DE VOS A.J. (1995). Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.*, **57**, 61–74.
9. CALDER J.A.M., REDDY G.R., CHIEVES L., COURTNEY C.H., LITTELL R., LIVENGOD J.R., NORVAL R.A.I., SMITH C. & DAME J.B. (1996). Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2748–2755.
10. CHRISTENSSON D.A. (1987). Clinical and serological response after experimental inoculation with *Babesia divergens* of newborn calves with and without maternal antibodies. *Acta Vet. Scand.*, **28**, 381–392.
11. DALGLIESH R.J. (1993). Babesiosis. In: Immunology and molecular biology of parasite infections, Warren S.K., ed., Blackwell, Oxford, UK, 352–383.
12. DE ECHAIDE S.T., ECHAIDE I.E., GAIDO A.B., MANGOLD A.J., LUGARES C.I., VANZINI V.R. & GUGLIELMONE A.A. (1995). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay kit to detect *Babesia bovis* antibodies in cattle. *Prev. Vet. Med.*, **24**, 277–283.
13. DE VOS A.J. & JORGENSEN W.K. (1992). Protection of cattle against babesiosis in tropical and subtropical countries with a live, frozen vaccine. In: Tick Vector Biology: Medical and Veterinary Aspects, Fivaz B., Petney T. & Horak I., eds. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 159–174.
14. DOMINGUEZ M., ZABAL O., WILKOWSKY S., ECHAIDE I., TORIONI DE ECHAIDE S., ASENZO G., RODRIGUEZ A., ZAMORANO P., FARBER M., SUAREZ C. & FLORIN-CHRISTENSEN, M. (2004). Use of a monoclonal antibody against *Babesia bovis* merozoite surface antigen-2c for the development of a competitive ELISA test. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1026**, 165–170.

15. EDELHOFER R., KANOUT A., SCHUH M. & KUTZER E. (1998). Improved disease resistance after *Babesia divergens* vaccination. *Parasitol. Res.*, **84**, 181–187.
16. EL-GAYSH A., SUNDQUIST B., CHRISTENSSON D.A., HILALI M. & NASSER A. M. (1996). Observations on the use of ELISA for detection of *Babesia bigemina* specific antibodies. *Vet. Parasitol.*, **62**, 51–61.
17. FIGUEROA J.V., CHIEVES L.P., JOHNSON G. S. & BUENING G. M. (1992). Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2576–2582.
18. FRIEDHOFF K.T. (1988). Transmission of *Babesia*. In: *Babesiosis of Domestic Animals and Man*, Ristic M., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 23–52.
19. FRIEDHOFF K. & BOSE R. (1994). Recent developments in diagnostics of some tick-borne diseases. In: *Use of Applicable Biotechnological Methods for Diagnosing Haemoparasites. Proceedings of the Expert Consultation, Merida, Mexico, 4–6 October 1993*, Uilenberg G., Permin A. & Hansen J.W., eds. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 46–57.
20. GOFF W.L., McELWAIN T.F., SUAREZ C.E., JOHNSON W.C., BROWN W.C., NORIMINE J. & KNOWLES D. P. (2003). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a rhoptry-associated protein 1 epitope specifically identifies *Babesia bovis*-infected cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10**, 38–43.
21. GUBBELS J.M., DE VOS A.P., VAN DER WEIDE M., VISERAS J., SCHOULS L.M., DE VRIES E. & JONGEJAN F. (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1782–1789.
22. HOLMAN P.J., WALDRUP K.A., DROLESKEY R.E., CORRIER D.E. & WAGNER G.G. (1993). *In vitro* growth of *Babesia bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) erythrocytes. *J. Parasitol.*, **79**, 233–237.
23. JORGENSEN W.K. & WALDRON N S.J. (1994). Use of *in vitro* culture to isolate *Babesia bovis* from *Theileria buffeli*, *Eperythrozoon wenyoni* and *Anaplasma* spp. *Vet. Parasitol.*, **53**, 45–51.
24. JORGENSEN W.K., WALDRON S.J., McGRATH J., ROMAN R.J., DE VOS A.J. & WILLIAMS K.E. (1992). Growth of *Babesia bigemina* parasites in suspension cultures for vaccine production. *Parasitol. Res.*, **78**, 423–426.
25. KUNG’U M.W. & GOODGER B.V. (1990). A slide enzyme-linked assay (SELISA) for the diagnosis of *Babesia bovis* infections and for the screening of *Babesia*-specific monoclonal antibodies. *Int. J. Parasitol.*, **20**, 341–345.
26. MADRUGA C.R., KESSLER R.H., SCHENK M.A.M., HONER M.R. & MIQUITA M. (1995). Analise de testes de congulinacao rapida para deteccao de anticorpos contra *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, **47**, 649–657.
27. MANGOLD A.J., VANZINI V.R., ECHAIDE I.E., DE ESCHAIDE S.T., VOLPOGNI M.M. & GUGLIELMONE A.A. (1996). Viability after thawing and dilution of simultaneously cryopreserved vaccinal *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* strains cultured *in vitro*. *Vet. Parasit.*, **61**, 345–348.
28. MELLORS L.T., DALGLIESH R.J., TIMMS P., RODWELL B.J. & CALLOW L.L. (1982). Preparation and laboratory testing of a frozen vaccine containing *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma centrale*. *Res. Vet. Sci.*, **32**, 194–197.
29. MOLLOY J.B., BOWLES P.M., BOCK R.E., TURTON J.A., KATSANDE T.C., KATENDE J.M., MABIKACHECHE L.G., WALDRON S.J., BLIGHT G.W. & DALGLIESH R.J. (1998). Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bovis* in cattle in Australia and Zimbabwe. *Prev. Vet. Med.*, **33**, 59–67.
30. MOLLOY J.B., BOWLES P.M., JESTON P.J., BRUYERES A.G., BOWDEN J.M., BOCK R.E., JORGENSEN W.K., BLIGHT G.W. & DALGLIESH R.J. (1998). Development of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle in Australia. *Parasitol. Res.*, **84**, 651–656.
31. MONTENEGRO-JAMES S., GUILLEN T. & TORO M. (1992). Dot-ELISA para diagnostico serologico de la anaplasmosis y babesiosis bovina. *Rev. Cientifica [FCV de Luz.]*, **2**, 23.
32. MONTENEGRO-JAMES S., TORO M., LEON E., GUILLEN A.T., LOPEZ R. & LOPEZ W. (1992). Immunisation of cattle with an inactivated polyvalent vaccine against anaplasmosis and babesiosis. *Ann. NY Acad. Sci.*, **653**, 112–121.

33. MUSOKE A.J., PALMER G.H., McELWAIN T.F., NENE V. & McKEEVER D. (1996). Prospects for subunit vaccines against tick-borne diseases. *Br. Vet. J.*, **152**, 621–639.
34. OLIVEIRA-SEQUEIRA T.C., OLIVEIRA M.C., ARAUJO J. P., JR & AMARANTE A.F. (2005). PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int. J. Parasitol.*, **35**, 105–111.
35. PIPANO E. (1997). Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Trop. Anim. Health Prod.*, **29** (Suppl.), S86–S90.
36. SALEM G.H., LIU X.-J., JOHNSRUDE J.D., DAME J.B. & ROMAN REDDY G. (1999). Development and evaluation of an extra chromosomal DNA-based PCR test for diagnosing bovine babesiosis. *Mol. Cell. Probes*, **13**, 107–113.
37. SPARAGANO O. (1999). Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species. *J. Vet. Parasitol.*, **13**, 83–92.
38. THAMMASIRIRAK S., SIRITEPTAWEE J., SATTAYASAI N., INDRAKAMHANG P. & ARAKI T. (2003). Detection of *Babesia bovis* in cattle by PCR-ELISA. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, **34**, 751–757.
39. WALTISBUHL D.J., GOODGER B.V, WRIGHT I.G., COMMINS M.A. & MAHONEY D.F. (1987). An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. *Parasitol. Res.*, **73**, 126–131.
40. WINGER C.M., CANNING E.U. & CULVERHOUSE J.D. (1989). A strain of *Babesia divergens* attenuated after long-term culture. *Res. Vet. Sci.*, **46**, 110–113.
41. ZINTL A., MULCAHY G., SKERRETT H.E., TAYLOR S.M. & GRAY J.S. (2003). *Babesia divergens*: A Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance. *Clin. Microbiol. Rev.*, **16**, 622–636.

*

* *

NB: Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la babésiose bovine (voir le Tableau dans la Partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée: www.oie.int).

BRUCELLOSE BOVINE

RÉSUMÉ

*La brucellose bovine est généralement due à *Brucella abortus*, moins souvent à *B. melitensis*, et à *B. suis*. L'infection est présente au niveau mondial. La plupart des pays d'Europe centrale et septentrionale, le Canada, le Japon, l'Australie et la Nouvelle-Zélande sont considérés comme indemnes de l'infection.*

*Cliniquement, la maladie se manifeste par l'un ou plusieurs des signes suivants : avortement, rétention placentaire, orchite, épididymite et, rarement, arthrite, avec excrétion de *Brucella* dans les sécrétions utérines et le lait. Le diagnostic de certitude repose sur l'isolement de *Brucella* à partir de prélèvements d'avortement, des sécrétions mammaires ou de prélèvements post mortem. Le diagnostic présomptif repose sur la mesure de l'immunité cellulaire ou humorale dirigée contre les antigènes de *Brucella*.*

**Brucella abortus*, *B. melitensis* et *B. suis* sont fortement pathogènes pour l'homme et tous les organes infectés, les cultures et tous les matériels potentiellement contaminés doivent être manipulés dans des conditions de sécurité appropriées.*

Identification de l'agent pathogène : *la mise en évidence de bactéries acido-résistantes à la morphologie évocatrice dans des produits d'avortement ou des sécrétions vaginales constitue une présomption de brucellose, à fortiori si la sérologie est positive. Les techniques de PCR récemment développées permettent également la détection de l'agent. Les *Brucella* doivent être, si possible, recherchées par culture, sur des milieux sélectifs ou non, à partir des sécrétions utérines, de l'avorton, des sécrétions mammaires ou d'organes, comme les nœuds lymphatiques, les organes reproducteurs mâles et femelles. Espèce et biovar seront caractérisés sur la base du lysotype et de critères culturels, biochimiques et sérologiques. La réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) constitue une méthode à la fois de diagnostic complémentaire et de typage basée sur les séquences génomiques spécifiques.*

Épreuves sérologiques et cutanées allergique : *les épreuves à l'antigène tamponné, rose Bengale et BPAT (Buffered Plate Agglutination Test), la fixation du complément, la réaction immuno-enzymatique (ELISA) ou les tests de polarisation de fluorescence (FPA), sont des épreuves utilisables pour le dépistage des troupeaux ou des animaux. Cependant, aucune épreuve sérologique n'est appropriée, à elle seule, à toutes les situations épidémiologiques. Aussi les échantillons positifs aux épreuves de dépistage doivent-ils être confirmés selon une stratégie établie. Le dépistage de la brucellose en troupeaux laitiers est possible sur lait de mélange par l'ELISA indirect ou l'épreuve de l'anneau (ou ring-test), cette dernière épreuve étant moins fiable en grands troupeaux. L'épreuve cutanée allergique à la brucelline, autre épreuve immunologique disponible, peut être utilisée en dépistage ou comme épreuve de confirmation de troupeau lors de réactions sérologiques positives en l'absence de tout facteur de risque patent de brucellose en troupeau non vacciné. Les tests de l'interféron gamma, de précipitation avec l'haptène natif comme antigène et ELISA indirects utilisant le lipopolysaccharide de la phase rugueuse comme antigène se sont révélés prometteurs pour distinguer la brucellose des infections par des micro-organismes qui donnent des réactions croisées.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *la souche vaccinale 19 de *Brucella abortus* (B19) demeure le vaccin de référence auquel tout candidat vaccin doit être comparé. Le vaccin doit être préparé à partir de cultures dérivées de la souche mère étasunienne, et chaque lot doit répondre à des exigences minimales en matière de viabilité, phase de dissociation, virulence résiduelle et immunogénicité sur souris éprouvées par*

une souche virulente de *B. abortus* ou titré pour chaque dose (nombre d'unité formant colonie : UFC). La souche vaccinale RB51 de *Brucella abortus* a été produite à partir d'un mutant en laboratoire de la souche lisse 2308 de *B. abortus*. Les tests d'efficacité du vaccin RB-51 ont été finalisés et il a reçu une autorisation de mise sur le marché aux États-Unis d'Amérique. Dans d'autres pays, ce vaccin est devenu également le vaccin officiel pour le contrôle de la brucellose chez les bovins. Les préparations de brucelline pour l'épreuve cutanée allergique doivent être exemptes de lipopolysaccharide lisse (LPS-S pour smooth lipopolysaccharide) et ne doivent induire aucune réaction inflammatoire non spécifique ou interférer avec les épreuves sérologiques. Les antigènes de diagnostic doivent être préparés à partir de cultures lisses de *B. abortus* souches 1119-3 ou 99 et répondre à des exigences minimales en matière de pureté, sensibilité et spécificité.

A. INTRODUCTION

La brucellose bovine est habituellement due à l'un des biovars de *Brucella abortus*. Dans certains pays, particulièrement en Europe méridionale et en Asie occidentale, où les bovins sont au contact étroit des ovins et des caprins, l'infection peut également être causée par *B. melitensis* (41). Occasionnellement, *B. suis* peut induire une infection mammaire chronique chez les bovins, mais il n'a pas été rapporté d'avortement ou de transmission à d'autres espèces (29). La maladie est généralement asymptomatique chez les femelles non gestantes. Après infection par *B. abortus* ou *B. melitensis*, les femelles adultes gestantes développent une placentite conduisant généralement à l'avortement entre le 5^e et le 9^e mois de gestation. Même en l'absence d'avortement, une importante quantité de bactéries est excrétée dans le placenta, les sécrétions vaginales et fœtales. La glande mammaire et les nœuds lymphatiques associés peuvent aussi être infectés et les *Brucella* peuvent être excrétées dans le lait. Les gestations suivantes sont généralement menées à terme mais l'infection utérine et mammaire subsiste, avec une quantité réduite de *Brucella* excrétée dans les produits génitaux et mammaires. Lors d'infection aiguë, les *Brucella* sont présentes dans les principaux nœuds lymphatiques de l'organisme. Les bovins mâles adultes peuvent développer une orchite et la brucellose peut être à l'origine d'infertilité dans les deux sexes. L'hygroma (inflammation des bourses séreuses) impliquant généralement les articulations des membres constitue une manifestation classique de la brucellose dans certains pays tropicaux et peut être le seul signe de l'infection ; le liquide d'hygroma est souvent infecté par des *Brucella*.

Le dromadaire (*Camelus dromedarius*), le chameau (*C. bactrianus*) et les camélidés d'Amérique du sud, le lama (*Lama glama*), l'alpaga (*Lama pacos*), le guanaco (*Lama guanicoe*) et la vigogne (*Vicugna vicugna*) peuvent être atteints de brucellose, après contact avec des grands ou petits ruminants infectés par *B. abortus* ou *B. melitensis*. Par ailleurs, la brucellose a été observée chez le buffle domestique (*Bubalus bubalis*), le bison américain ou européen (*Bison bison*, *Bison bonasus*), le yack (*Bos grunniens*), le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) ou encore le buffle africain (*Syncerus caffer*) et diverses espèces d'antilopes africaines. Les manifestations de la brucellose dans ces espèces sont similaires à celles observées chez les bovins.

La Manuel de sécurité biologique en laboratoire de l'Organisation mondiale de la santé classe les *Brucella* dans le groupe de risque III. La brucellose est aisément contractée par l'homme, chez qui elle cause un syndrome fébrile aigu – la fièvre ondulante – qui peut évoluer vers une forme plus chronique et également induire de sérieuses complications articulaires, cardiovasculaires ou neurologiques. L'infection est souvent liée à une exposition professionnelle et est plus particulièrement contractée par les voies orale, conjonctivale ou respiratoire. Le risque est important pour les vétérinaires et les éleveurs qui manipulent les animaux infectés et les avortons ou placentas. Dans les pays où la maladie est enzootique, toutes les précautions doivent être prises pour éviter l'infection humaine, l'ingestion de produits laitiers constituant le risque majeur pour la population. La brucellose est l'une des infections acquises au laboratoire les plus fréquentes. Aussi, des règles strictes de sécurité doivent-elles être respectées pour la manipulation des cultures et des prélèvements fortement infectés, tels que les produits d'avortement. Des recommandations spécifiques ont été établies concernant les précautions de sécurité à respecter en présence de produits contaminés par *Brucella* (pour de plus amples détails voir refs. 2, 42, 95 et le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries »). La manipulation au laboratoire de cultures vivantes ou de produits provenant d'animaux infectés est dangereuse et doit être effectuée en niveau 3 de biosécurité ou plus, comme souligné au Chapitre 1.1.2., pour réduire l'exposition professionnelle. Le niveau 3 de biosécurité est indispensable quand de gros volumes de *Brucella* sont manipulés (production d'antigène ou de vaccin).

Des arguments génétiques et immunologiques indiquent que toutes les espèces et biovars du genre *Brucella* sont très proches. Néanmoins, sur la base de réelles différences en termes de préférence d'hôte et d'épidémiologie pour les différentes espèces et d'arguments moléculaires sur la diversité génomique, Le sous-comité de taxonomie des *Brucella* du Comité international de systématique des procaryotes a pris clairement position pour un retour à la classification des *Brucella* qui prévalait avant 1986 ; les conséquences de cette déclaration implique le maintien de la classification des *Brucella* en 6 espèces (*nomenclatures*) classiques et des biovars. Les dénominations classiques des 6 espèces de *Brucella* (et des souches-types qui y sont rattachées) sont publiées

dans les Listes approuvées des noms de bactéries (*Approved Lists of Bacterial Names*) de 1980 : *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* et *B. canis* (<http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm>). Les trois premières sont subdivisées en biovars sur la base de caractères culturels et sérologiques (voir Tableaux 1 et 2). Des souches de *Brucella*, qui n'entrent pas dans la classification des espèces ci-dessus, ont été isolées ces dix dernières années de mammifères marins (28, 31). Des recherches sont en cours pour déterminer leur position taxonomique dans le genre et il est actuellement proposé de les répartir entre deux nouvelles espèces, *B. ceti* et *B. pinnipedialis* (18, 31, 40). Enfin, les *Brucella* affichent une proximité génétique avec quelques bactéries pathogènes ou symbiotiques des plantes des genres *Agrobacterium* et *Rhizobium*, avec des pathogènes animaux (*Bartonella*) et avec des bactéries opportunistes ou telluriques (*Ochrobactrum*).

Tableau 1. Caractéristiques différentielles des espèces du genre *Brucella*

Espèce	Morphologie des colonies ^b	Exigence en sérum	Lyse par les phages ^a					Oxydase	Uréase	Hôte préférentiel
			Tb		Wb	Iz ₁	R/C			
			DCE	10 ⁴ DCE	DCE	DCE	DCE			
<i>B. abortus</i>	S	– ^d	+	+	+	+	–	+ ^e	+ ^f	Bovins et autres Bovidés
										Biovar 1 : porcs
										Biovar 2 : porcs, lièvres
<i>B. suis</i>	S	–	–	+	+ ^g	+ ^g	–	+	+ ^h	Biovar 3 : porcs
										Biovar 4 : rennes
										Biovar 5 : rongeurs sauvages
<i>B. melitensis</i>	S	–	–	–	– ⁱ	+	–	+	+ ^j	Ovins et caprins
<i>B. neotomae</i>	S	–	– ^k	+	+	+	–	–	+ ^h	Néotomes ^l
<i>B. ovis</i>	R	+	–	–	–	–	+	–	–	Béliers
<i>B. canis</i>	R	–	–	–	–	–	+	+	+ ^h	Chiens

D'après réfs 2 et 42.

a Phages : Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar1(Iz1) et R/C

b Phase naturelle : S : lisse, R : rugueuse

c DCE : dilution courante d'épreuve

d Le biovar 2 de *Brucella abortus* nécessite habituellement du sérum à l'isolement primaire

e Sauf certaines souches africaines de *B. abortus* biovar 3 qui sont négatives

f Moyennement rapide, sauf la souche 544 et quelques souches de terrain qui sont négatives

g Certaines souches de *B. suis* biovar 2 ne sont pas lysées ou le sont partiellement par les phages Wb ou Iz

h Rapide

i Certaines souches sont lysées par le phage Wb

j Peu rapide, certaines souches peuvent toutefois être rapides

k Plages de lyse

l *Neotoma lepida* (Néotome du désert)

Tableau 2. Caractéristiques différentielles des biovars des espèces de *Brucella*

Espèce	Biovar	Exigences en CO ₂	Production de H ₂ S	Croissance avec additif ^a		Agglutination avec du sérum monospécifique		
				Thionine	Fuchsine basique	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	1	–	–	+	+	–	+	–
	2	–	–	+	+	+	–	–
	3	–	–	+	+	+	+	–
<i>B. abortus</i>	1	+ ^b	+	–	+	+	–	–
	2	+ ^b	+	–	–	+	–	–
	3	+ ^b	+	+	+	+	–	–
	4	+ ^b	+	–	+ ^c	–	+	–
	5	–	–	+	+	–	+	–
	6	–	–	+	+	+	–	–
	9	+ or –	+	+	+	–	+	–
<i>B. suis</i>	1	–	+	+	– ^e	+	–	–
	2	–	–	+	–	+	–	–
	3	–	–	+	+	+	–	–
	4	–	–	+	– ^f	+	+	–
	5	–	–		–	–	+	–
<i>B. neotomae</i>	–	–	+	– ^g	–	+	–	–
<i>B. ovis</i>	–	+	–	+	– ^f	–	–	+
<i>B. canis</i>	–	–	–	+	– ^f	–	–	+

D'après les réfs 2 et 42.

- a La concentration de l'additif dans le milieu constitué de sérum et de dextrose est de : 20 µg/ml
b Habituellement positif lors de la première isolation
c Des souches sensibles à la fuchsine basique ont été isolées
d Des souches sont inhibés par les additifs
e Des souches résistantes à la fuchsine basique ont été isolées
f Négatif pour la plupart des souches
g Croissance à une concentration de 10 µg/ml de thionine

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Tous les avortements bovins devraient être considérés comme une suspicion de brucellose et faire l'objet d'analyses. Ce signe n'est nullement pathognomonique, mais l'histoire du troupeau peut orienter dans un tel cas. Le diagnostic de certitude des infections à *Brucella* repose sur l'isolement et l'identification de la bactérie, mais, lorsque la bactériologie ne peut être mise en œuvre, le diagnostic peut reposer sur la sérologie. Il n'existe pas d'épreuve unique permettant d'identifier une bactérie comme étant une *Brucella*. L'association des caractéristiques de croissance aux résultats d'épreuves sérologiques, bactériologiques et/ou moléculaires est généralement nécessaire.

1. Identification de l'agent pathogène (2, 20, 21, 42)

a) Bactérioscopie

Les *Brucella* sont des coccobacilles mesurant de 0,6 à 1,5 µm de long et de 0,5 à 0,7 µm de large, généralement isolés, rarement en paires ou en amas. La morphologie des *Brucella* est assez constante, sauf dans les cultures anciennes où des formes pléiomorphiques peuvent apparaître. Les *Brucella* sont immobiles. Elles ne forment ni spores, ni flagelles, ni pili, ni capsules. Les *Brucella* sont à Gram négatif et ne montrent habituellement pas de coloration bipolaire. Elles ne sont pas réellement acido-résistantes mais résistent à la décoloration par les acides faibles et sont ainsi colorées en rouge par la méthode de coloration de Ziehl-Neelsen modifiée par Stamp. Cette méthode est classiquement utilisée pour l'examen de frottis d'organes ou de fluides biologiques préalablement fixés par la chaleur ou l'éthanol ; les *Brucella* apparaissent alors en rouge sur fond bleu. Une technique d'immunofluorescence ou d'immunoperoxydase peut également être utilisée (77). La présence d'organismes ayant la morphologie de *Brucella*, colorés en rouge par la méthode de Stamp ou spécifiquement colorés en immunofluorescence ou immunoperoxydase constitue une présomption de brucellose. Cependant, ces méthodes présentent une faible sensibilité pour le lait et les produits laitiers où les *Brucella* sont généralement en faible quantité et l'interprétation est souvent rendue difficile par la présence de globules gras. L'interprétation de résultats positifs en coloration de Stamp reste délicate car d'autres bactéries responsables d'avortements, comme *Chlamydophila abortus* (anciennement *Chlamydia psittaci*) ou *Coxiella burnetii*, sont difficiles à différencier des *Brucella*. Les résultats, positifs ou négatifs, doivent dans tous les cas être confirmés par culture.

Des méthodes de détection des *Brucella* par sonde ADN ou PCR peuvent être utilisées dans divers échantillons biologiques (11).

b) Culture

i) Milieux de base

L'isolement direct et la culture des *Brucella* sont habituellement réalisés sur milieu solide. Cette méthode est la méthode de choix car elle permet le développement de colonies pouvant être isolées et aisément reconnues. De tels milieux limitent également l'apparition de mutants rugueux et le développement excessif de contaminants. Cependant, les milieux liquides peuvent être recommandés pour les échantillons volumineux et pour l'enrichissement. Une grande variété de milieux de base commerciaux déshydratés est disponible, tels que le milieu de base pour *Brucella* (*Brucella* medium base), la gélose tryptose (ou trypticase)-soja (TSA). L'ajout de 2 à 5 % de sérum de bovin ou de cheval est nécessaire pour la croissance de souches telles que *B. abortus* biovar 2 et beaucoup de laboratoires ajoutent systématiquement du sérum aux milieux de base tels que la base pour gélose au sang (blood agar base [Oxoid]) ou la gélose Columbia (BioMérieux) avec d'excellents résultats. D'autres milieux sont satisfaisants tels que la gélose sérum-dextrose (serum-dextrose agar [SDA]) ou glycérol dextrose (2). Le SDA est généralement privilégié pour l'observation de la morphologie des colonies. Un milieu non sélectif et biphasique, le milieu de Castañeda, est recommandé pour l'isolement des *Brucella* à partir du sang et d'autres fluides biologiques comme le lait, pour lesquels un enrichissement est souhaitable. Ce milieu est utilisé du fait de la tendance des *Brucella* à dissocier en bouillon et la présence de bactéries rugueuses peut nuire au biotypage de la souche isolée.

ii) Milieux sélectifs

Tous les milieux de base cités plus haut peuvent être utilisés pour la préparation des milieux sélectifs. Une série d'antibiotiques est ajoutée pour inhiber la croissance de micro-organismes autres que *Brucella*. Le milieu sélectif le plus utilisé est le milieu de Farrell (30), préparé par l'ajout de 6 antibiotiques au milieu de base. Les quantités suivantes sont ajoutées à 1 litre de milieu : polymyxine B sulfate (5 000 unités = 5 mg) ; bacitracine (25 000 unités = 25 mg) ; natamycine (50 mg) ; acide nalidixique (5 mg) ; nystatine (100 000 unités) ; vancomycine (20 mg).

Un supplément antibiotique lyophilisé est disponible dans le commerce (Oxoid). Cependant, l'acide nalidixique et la bacitracine, à la concentration utilisée dans le milieu de Farrell, peuvent avoir un pouvoir inhibiteur sur certaines souches de *B. abortus* et de *B. melitensis* (50). Aussi, la sensibilité du

diagnostic augmente-t-elle significativement lorsqu'on utilise le milieu modifié de Thayer-Martin simultanément au milieu de Farrell. Le milieu modifié de Thayer-Martin peut être préparé à partir d'une base de milieu GC (38 g/litre ; Laboratoire Biolife, Milan, Italie) à laquelle sont ajoutées hémoglobine (10 g/litre ; Difco) ainsi que colistine (méthanesulfonate [7,5 mg/litre]), vancomycine (3 mg/litre), nitrofurantoïne (10 mg/litre), nystatine (100 000 unités/litre = 17,7 mg) et amphotéricine B (2,5 mg/litre) (tous ces produits sont disponibles chez Sigma Chemical USA) (50). À l'inverse de plusieurs biovars de *B. abortus*, la croissance de *B. melitensis* n'est pas dépendante d'un enrichissement avec 5 à 10 % de CO₂ de l'atmosphère (Tableau 2).

Un enrichissement est conseillé pour les prélèvements dans lesquels le nombre de *Brucella* est plus faible que dans les produits d'avortement comme le lait, le colostrum et certains organes. Dans le cas du lait, les résultats sont également améliorés par centrifugation puis culture à partir de la crème et du culot. L'enrichissement peut être fait en milieu liquide, tel que bouillon sérum-dextrose, bouillon tryptose (ou trypticase)-soja (TSA) ou bouillon *Brucella* renfermant le mélange antibiotique minimal suivant : amphotéricine B (1 µg/ml) et vancomycine (20 µg/ml) (concentrations finales). Le milieu d'enrichissement est incubé à 37 °C en atmosphère enrichie à 5 à 10 % (v/v) de CO₂ pendant 6 semaines, en effectuant des subcultures hebdomadaires sur milieu solide sélectif. Si on souhaite limiter les subcultures il est possible d'utiliser un milieu biphasique comprenant un milieu sélectif solide et un milieu sélectif liquide dans la même bouteille (technique de Castañeda). Pour l'isolement des *Brucella* à partir du lait, on recommande parfois un milieu biphasique composé du milieu de base de Castañeda additionné des antibiotiques suivants à la phase liquide : polymyxine B (sulfate) (6 000 unités = 6 mg) ; bacitracine (25 000 unités = 25 mg) ; natamycine (50 mg) ; acide nalidixique (5 mg) ; amphotéricine B (1 mg) ; vancomycine (20 mg) ; D-cyclosérine (100 mg) (quantités par litre de milieu).

Tous les milieux de culture doivent être soumis à un contrôle de qualité et devraient permettre la croissance de faibles inoculums de souches fastidieuses, comme le biovar 2 de *B. abortus*. Celui-ci est la souche sélectionnée aux États-Unis ; les laboratoires qui ne possèdent pas de permis pour une souche sélectionnée peuvent utiliser une souche de substitution non inscrite telle que la souche 19 ou RB51 pour le contrôle de qualité des milieux, tout en gardant présent à l'esprit que ces souches, adaptées au laboratoire, cultiveront sur des milieux qui pourraient inhiber des souches de *Brucella* à croissance difficile.

Sur milieu solide approprié, les colonies de *Brucella* sont visibles après 2 à 3 jours d'incubation. Après 4 jours d'incubation, les colonies de *Brucella* sont rondes, aux bords lisses, de 1 à 2 mm de diamètre. Elles sont translucides, de couleur jaune pâle lorsqu'on regarde les boîtes à la lumière du jour au travers (milieu transparent nécessaire). Vues de dessus, les colonies apparaissent convexes et blanc nacré. Plus tard, les colonies s'élargissent et s'assombrissent.

Les cultures lisses (S pour « smooth ») de *Brucella* ont tendance, au cours des repiquages notamment, à évoluer pendant la croissance et à se dissocier vers des formes rugueuses (R). Les colonies sont alors moins transparentes plus granuleuses et plus ternes, et d'une couleur allant du blanc mat au brun en lumière réfléchiée et transmise. Le contrôle de dissociation s'effectue aisément par la méthode de coloration au cristal violet : les colonies rugueuses se colorent en rouge-violet et les colonies lisses restent jaune pâle. Les colonies lisses sont ensuite éprouvées avec un sérum anti-*Brucella* S ou, mieux, avec les sérums monospécifiques dirigés contre les antigènes de surface A et M. Les colonies non lisses sont ensuite éprouvées avec un sérum anti-*Brucella* R. Les changements dans la morphologie des colonies s'accompagnent souvent de modifications en termes de virulence, de propriétés sérologiques et/ou de sensibilité aux phages. L'observation d'une agglutination par un sérum anti-*Brucella* constitue une identification présumptive et l'identification complète doit être mise en œuvre par un laboratoire de référence.

iii) Collecte et mise en culture des échantillons

Le choix des prélèvements pour la recherche de brucellose par culture dépend des signes cliniques observés. Les échantillons de choix sont : l'avorton (contenu de l'estomac, rate et poumon), les annexes fœto-maternelles et les sécrétions génitales (écouvillons vaginaux), le lait, le sperme et les liquides d'arthrite ou d'hygroma. Sur la carcasse, les prélèvements de choix pour la culture concernent : le système réticulo-endothélial (nœuds lymphatiques céphaliques, mammaires et génitaux et la rate), l'utérus dans les derniers stades de gestation ou en post-partum/abortum ainsi que la mamelle. Une croissance peut être observée après 3 à 4 jours mais les cultures doivent être conservées 8 à 10 jours avant de considérer un résultat négatif.

Organes : les prélèvements sont effectués de manière aseptique avec des instruments stériles. Les échantillons sont préparés en retirant les tissus superflus (par exemple, la graisse), coupés en petits morceaux, puis broyés dans un stomacher ou broyeur équivalent en présence d'un faible volume de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) stérile avant un ensemencement sur milieu solide.

Sécrétions vaginales : un écouvillon vaginal prélevé après avortement ou parturition constitue un excellent prélèvement pour la recherche des *Brucella* tout en étant beaucoup moins dangereux pour le

manipulateur que d'autres prélèvements d'avortement. L'écouvillon est ensemencé directement sur le milieu solide.

Lait : les échantillons de lait sont prélevés proprement après nettoyage et essuyage de la mamelle entière et désinfection des trayons. Les échantillons doivent contenir le contenu des 4 quartiers, 10 à 20 ml étant prélevés pour chaque trayeron. Les premiers jets sont rejetés et le prélèvement est effectué en direct dans un récipient stérile. Il faut éviter tout contact entre le lait et les mains du trayeur. Le lait est ensuite centrifugé entre 6 000 et 7 000 *g* pendant 15 min, ou à 2 000 *g* pendant 30 min, en tubes fermés (pour éviter le risque de contamination du personnel par les aérosols). La crème et le culot sont ensuite ensemencés sur milieu solide, soit séparément soit en mélange. La recherche par culture sur les laits de mélange en citerne a peu de chances d'aboutir car les *Brucella*, lorsqu'elles y sont présentes, le sont généralement en faible concentration.

Produits laitiers : ces produits, les fromages notamment, sont mis en culture sur les milieux cités plus haut. Ils renferment en général une faible concentration de bactéries et un enrichissement est souhaitable. Une homogénéisation soigneuse de l'échantillon est nécessaire avant mise en culture. Celle-ci est obtenue par l'utilisation d'un broyeur de tissus électrique ou appareil de type stomacher en présence d'un volume adéquat de tampon PBS stérile. Les couches superficielles (croûte et parties sous-jacentes) ainsi que le cœur du produit doivent être ensemencés. La croissance, la survie ou la disparition des *Brucella* et donc la distribution des *Brucella* dans les différentes parties du produit varient selon les conditions physico-chimiques locales et des procédés technologiques de fabrication utilisés pour le produit considéré.

Tous les échantillons doivent être refroidis immédiatement après prélèvement et transportés vers le laboratoire aussi rapidement que possible. À l'arrivée au laboratoire, les échantillons de lait ou d'organe doivent être congelés s'ils ne peuvent être ensemencés rapidement.

L'utilisation d'animaux de laboratoire doit être évitée autant que possible, mais elle peut néanmoins permettre parfois la détection de *Brucella* lorsque les échantillons sont très contaminés ou lorsque les *Brucella* y sont présentes en très faible nombre. Les animaux sont inoculés soit par voie sous-cutanée ou sur la peau érodée chez le cobaye ou, mieux, par voie intraveineuse chez la souris. Ce travail doit être accompli en conditions appropriées de biosécurité, comme indiqué au Chapitre 1.1.2. Les rates de souris sont mises en culture 7 jours après inoculation et pour les cobayes, un échantillon de sérum est analysé en sérologie 3 à 6 semaines après inoculation, puis la rate est ensemencée.

c) Identification et typage

Toute colonie ayant la morphologie d'une *Brucella* est contrôlée par la coloration de Gram (ou de Stamp) d'un frottis. Dans la mesure où les propriétés antigéniques comme la sensibilité aux phages et aux colorants des *Brucella* peuvent être altérées par la dissociation des colonies, il est impératif que la morphologie des colonies soit contrôlée avant mise en œuvre des épreuves de typage décrites ci-après. Les méthodes recommandées pour l'observation de la morphologie des colonies sont celles de Henry par transillumination oblique, le test de l'acriflavine de Braun et Bonestell ou la méthode de coloration des colonies au cristal violet de White et Wilson (2).

L'identification des *Brucella* requiert l'étude des caractères suivants : coloration de Gram ou Stamp et morphologie de la bactérie, morphologie des colonies, caractéristiques de croissance, uréase, oxydase et catalase, ainsi qu'une épreuve d'agglutination sur lame avec un sérum polyclonal anti-*Brucella*. L'identification de l'espèce et celle du biovar requièrent des épreuves plus sophistiquées (telles la lyse par les phages et l'agglutination par les sérums spécifiques anti-A, -M ou -R), du ressort des laboratoires de référence ayant la maîtrise de ces techniques. L'utilisation en parallèle de plusieurs bactériophages tels que Tbilissi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar (Iz) et R/C permet, dans de tels laboratoires, une identification pratique des espèces lisses et rugueuses de *Brucella*. Cependant, plusieurs caractères comme la dépendance en CO₂, la production d'H₂S (détectée sur des papiers à l'acétate de plomb), comme la croissance en présence de fuchsine basique ou de thionine aux concentrations finales de 20 µg/ml, sont révélés par des épreuves de routine pouvant être mises en œuvre dans des laboratoires non spécialisés disposant d'un équipement minimal (voir Tableaux 1 et 2).

Lors d'envoi de souches de *Brucella* pour typage à un laboratoire de référence, il est essentiel de sélectionner des colonies lisses. Les cultures doivent être lyophilisées en ampoules scellées disposées dans des boîtes fermées à vis ou sous forme de tubes de culture en pente sur milieu approprié insérées dans des étuis fermés à vis. Les souches peuvent également être mises en milieu de transport (Amies par exemple), mais ce système peut être à l'origine de mutants rugueux.

- i) Les *Brucella* sont parmi les bactéries les plus dangereuses à manipuler en terme d'infections acquises au laboratoire. Pour le transport des cultures de *Brucella*, les bouchons des boîtes et étuis doivent être vissés fermement et scellés au moyen d'adhésif PVC. Les étuis doivent être enveloppés dans du papier absorbant ou de la ouate de coton, puis disposés en sacs scellés de polyéthylène eux-mêmes au sein d'un emballage rigide conforme aux exigences de l'Association Internationale du Transport

Aérien (IATA) sur le transport des matières dangereuses (39). Ces règles sont résumées au Chapitre 1.1.1., « Prélèvement et expédition des échantillons pour le diagnostic », et elles doivent être respectées. En tant qu'agents infectieux, les cultures de *Brucella* sont désignées sous le sigle UN 2814 et une Déclaration de transport de matières dangereuses (« Declaration of Dangerous Goods ») doit être remplie. Il existe aussi des restrictions concernant l'envoi de prélèvements suspects de brucellose et les règles IATA doivent être vérifiées avant envoi des prélèvements (39). Les autres règles internationales et nationales doivent également être respectées (96).

- ii) Avant l'envoi de cultures ou de prélèvements pour culture, le laboratoire destinataire doit être contacté pour savoir si un permis spécifique est requis et si le laboratoire a la capacité de mise en œuvre de l'analyse. Si les échantillons doivent traverser une frontière, une autorisation d'importation est probablement nécessaire et doit être obtenue avant envoi des échantillons (Chapitre 1.1.2.).

d) Méthodes d'identification des acides nucléiques

La technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) récemment développée constitue un moyen additionnel de détection et d'identification des *Brucella* sp. (11, 14-16, 69). Malgré le fort degré d'homologie ADN au sein du genre *Brucella*, plusieurs techniques moléculaires, PCR, PCR-Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PCR-RFLP) et Southern blot, ont été mises au point qui permettent, dans une certaine mesure, une différenciation entre espèces de *Brucella* et entre certains de leurs biovars (pour une revue voir refs 11 et 53). L'électrophorèse en champs pulsés (PFGE) permet également la différenciation de plusieurs espèces de *Brucella* (40, 51). Le typage des *Brucella* et la distinction des diverses souches vaccinales peuvent être réalisés avec succès par PCR, mais celle-ci n'a été que partiellement validée pour une utilisation en tant que premier test de diagnostic.

La première épreuve de PCR multiplex spécifique d'espèce pour la différenciation de *Brucella* a été décrite par Bricker et Halling (15). L'épreuve dénommée AMOS-PCR était basée sur le polymorphisme de la localisation (variable selon les espèces) de la séquence IS711 sur le chromosome de *Brucella* ; elle comprend des amorces de 5 oligonucléotides qui peuvent identifier et différencier les biovars 1, 2 et 4 de *B. abortus*, mais ne peut pas différencier les biovars 3, 5, 6 et 9 de *B. abortus*. Des variantes de cette épreuve, dénommées BaSS PCR, ont été introduites afin d'améliorer les performances et de nouvelles amorces spécifiques de souche ont été incorporées pour l'identification des souches vaccinales de *B. abortus*, B19 et RB51 (14, 16, 26, 27). Les AMOS PCR et BaSS PCR sont toutes les deux des épreuves PCR multiplex à un tube. L'AMOS PCR fait la distinction jusqu'au niveau de l'espèce entre *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* et *B. suis* (seulement le biovar 1 quoique les autres biovars sont détectés avec les amorces ery). La BaSS PCR permet une différenciation supplémentaire des souches, spécialement les souches vaccinales, S10 et RB51. Les protocoles des deux tests sont identiques à la seule différence des amorces dans le mélange. Cependant, d'autres espèces et d'autres biovars (comme les biovars 3, 5, 6 et 9 de *B. abortus*, les biovars 2, 3, 4 et 5 de *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ceti* et *B. pinnipedialis*) ne peuvent pas être détectés par les épreuves AMOS PCR ou BaSS PCR.

Récemment, une modification supplémentaire des protocoles de ces PCR a été apportée afin d'identifier aussi les biovars 3, 5, 6 et 9 de *B. abortus* (69).

- Le protocole de la BaSS PCR est donné comme exemple (pour des instructions détaillées, voir les refs. 16 et 27).
- **Préparation des bactéries**
 - i) Toute méthode appropriée de purification de l'ADN est acceptable. Une méthode simple et efficace est de sélectionner une seule colonie et de la transférer à l'aide d'une anse de platine stérile dans 100 µl d'eau (degré PCR). La suspension bactérienne doit être portée à ébullition pendant au moins 5 min pour tuer les bactéries et pour faciliter la lyse de la plupart des bactéries comme matrice pour la réaction. La concentration des bactéries est ajustée avec du sérum physiologique à la densité de 1,5 à 2 unités d'absorption à 600 nm. Juste avant utilisation, la suspension bactérienne est re-mélangée et diluée au 1/10 dans de l'eau (degré PCR) (par exemple, 5 µl de suspension dans 45 µl d'eau). Mélanger doucement mais complètement. Le matériel dilué doit être éliminé de façon appropriée après usage.

- Séquences des amorces pour PCR et concentration des solutions

Amorces		Séquences nucléotidiques (de 5' vers 3')	Concentration des solutions (× 100)
Spécifique IS711	de	TGC-CGA-TCA-CTT-AAG-GGC-CTT-CAT-TGC-CAG	1,90 µg/µl
Spécifique de <i>Abortus</i>		GAC-GAA-CGG-AAT-TTT-TCC-AAT-CCC	1,55 µg/µl
16S-universel-F		GTG-CCA-GCA-GCC-GCC-GTA-ATA-C	1,40 µg/µl
16S-universel-R		TGG-TGT-GAC-GGG-CGG-TGT-GTA-CAA-G	1,60 µg/µl
eri-F		GCG-CCG-CGA-AGA-ACT-TAT-CAA	1,35 µg/µl
eri-R		CGC-CAT-GTT-AGC-GGC-GGT-GA	1,30 µg/µl
RB51-3		GCC-AAC-CAA-CCC-AAA-TGC-TCA-CAA	1,55 µg/µl

- Réaction d'amplification

- Préparation du mélange primaire (100 tests)

- Les oligonucléotides synthétiques doivent être dissous dans du tampon TE à une concentration ×100 (voir tableau ci-dessus). La solution ×100 est stable à 4 °C pendant au moins 2 ans, si toutes les précautions sont prises pour éviter les contaminations.
- Préparer le cocktail des amorces en distribuant les solutions concentrées ×100 dans des micro-tubes de 1,5 ml :

233 µl	eau de qualité PCR
2,5 µl	amorce spécifique de IS711
2,5 µl	amorce spécifique de <i>B. abortus</i>
2,5 µl	amorce F universelle de 16S (témoin accessoire pour les inhibiteurs)
2,5 µl	amorce R universelle de 16S (témoin accessoire pour les inhibiteurs)
2,5 µl	amorce F de eri
2,5 µl	amorce R de eri
2,5 µl	amorce RB51
- Préparer le mélange primaire en distribuant les solutions suivantes dans un tube à usage unique de 3 à 5 ml

1130 µl	eau de qualité PCR
250 µl	tampon de réaction ×1 sans MgCl ₂ (voir note 6)
150 µl	25 mM de MgCl ₂
200 µl	10 mM de mélange dNTP
250 µl	cocktail d'amorces (étape 2)
500 µl	GC Rich Enhancer. Si aucun produit de renforcement n'est utilisé, il faut alors substituer 500 µl d'eau de qualité PCR.
20 µl	ADN Taq polymérase FastStart™
- Mélanger soigneusement mais doucement la solution en pipetant.
- Distribuer le mélange primaire en aliquots de 25 µl dans des tubes de PCR à paroi mince de 0,2 µl (ou de manière alternative dans une plaque à 96 puits certifiée pour PCR). Conserver les tubes à –20 °C ±2 °C.
- Avant utilisation, décongeler suffisamment de tubes de mélange primaire pour tester les échantillons et les témoins et mélanger soigneusement en tapotant avec le doigt.

- Amplification par PCR

- Ajouter entre 1 et 2,5 ml d'échantillon à analyser ou de témoin dans chaque tube à essai. S'assurer que chaque échantillon est soigneusement mélangé juste avant de retirer l'aliquot, car les *Brucella* ont tendance à sédimenter rapidement.

- ii) Amplifier les produits de PCR selon les paramètres suivants :

95 °C	5 min		1 cycle
95 °C	15 s	}	40 cycles
52 °C	30 s		
72 °C	90 s		
4 °C	indéfiniment		

Le choix des différentes périodes de temps n'apparaît pas comme critique

- iii) Après amplification, les échantillons non ouverts peuvent être conservés indéfiniment à 4 °C jusqu'au moment de la détection.

- **Détection des produits amplifiés**

- Préparer un gel à 2 % d'agarose (dans du tampon TBE 0,5×) de 5 mm d'épaisseur et y creuser un nombre approprié de puits.
- Mélanger soigneusement 1 µl du colorant (concentré 6×) et 8 µl de l'échantillon amplifié avant de déposer le mélange dans un puits creusé dans le gel.
- Placer le gel dans du tampon TBE 0,5× jusqu'à ce que le bleu de bromophénol (qui sert de marqueur) soit à au moins 5 cm du puits afin d'obtenir une bonne séparation des bandes. Dans le système décrit ici, l'électrophorèse est réalisée sous 80 à 85 V pendant 2 h. 1/2 afin d'optimiser la résolution sans diffusion excessive des bandes, mais si d'autres matériels sont utilisés des ajustements peuvent être nécessaires.
- Colorer le gel pendant 45 min. avec une solution de bromure d'éthidium (250 µg/500 ml de tampon TBE 0,5×). Une autre solution consiste à colorer le gel avant électrophorèse ou pendant celle-ci en ajoutant le bromure d'éthidium au tampon d'électrophorèse. ATTENTION : le bromure d'éthidium est un produit potentiellement cancérigène.

- **Interprétation des résultats**

L'identification est fondée sur le nombre et les tailles des produits amplifiés par la PCR (voir figures A et B). Tous les échantillons (excepté les témoins négatifs) doivent présenter au moins 1 produit amplifié : la séquence 16S de 800 pb. Si cette bande n'est pas présente, l'échantillon contient peut-être des inhibiteurs de la PCR ou l'ADN a été dégradé ou encore l'échantillon n'a pas été distribué dans le mélange primaire. Il peut être nécessaire de diluer l'échantillon d'origine pour diminuer le niveau des inhibiteurs de la réaction et de répéter le test avec l'échantillon d'origine ou de recommencer le test avec un nouvel échantillon fraîchement collecté.

Tous les isolats de *Brucella abortus* (biovars 1, 2 et 4) y compris les souches vaccinales vont aussi amplifier un produit de 500 pb à partir du locus *alkB* de IS711. Les autres espèces de *Brucella* ou les autres bactéries ne vont pas amplifier ce produit. Seule la souche vaccinale RB51 de *B. abortus* amplifie un produit de 300 pb à partir du locus *wboA* de IS711. Toutes les espèces et toutes les souches de *Brucella* (à l'exception de la souche vaccinale B19 de *B. abortus*) amplifient un produit de 180 pb à partir du gène *ervA*, et les autres bactéries ne le font pas. Des résultats d'échantillon sont présentés dans la section B de la figure ci-dessous.

Un autre test, HOOF-Prints, a été mis au point récemment. Ce test de « fingerprinting » est un outil potentiellement efficace pour les études épidémiologiques (12, 13). Ce test consiste en une analyse du nombre variable des répétitions des tandems de locus multiple (MLVA pour *multiple locus variable number tandem repeats analysis*) et pourrait être un complément des méthodes classiques de typage car il s'accorde avec la taxonomie actuelle (45).

L'utilisation des techniques moléculaires pour l'identification des espèces de *Brucella* a considérablement augmenté et les procédures pour les tests se sont améliorés depuis les années 1990. D'autres tests tels que la PCR/RFLP pour le gène *omp 25*, 2a et 2b de *B. abortus* sont maintenant disponibles et peuvent être utilisés dans l'identification des espèces de *Brucella* (17, 18).

e) Identification des souches vaccinales

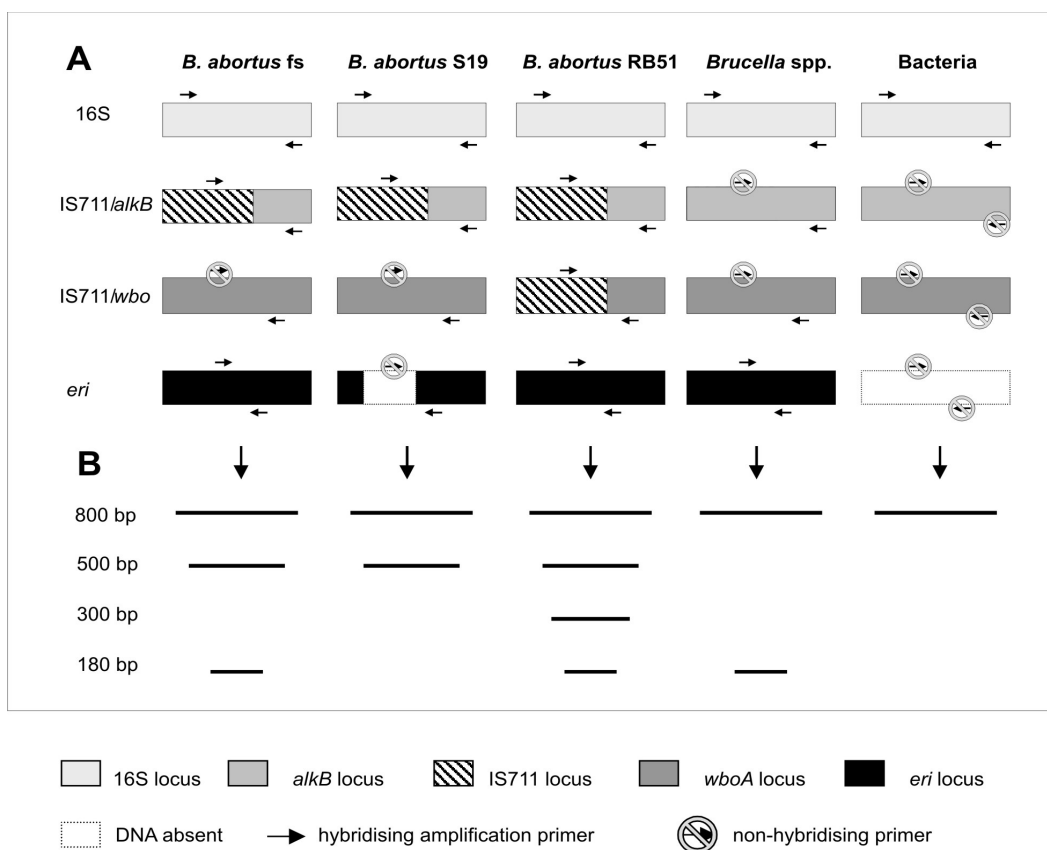
L'identification des souches vaccinales B19 et RB51 de *B. abortus* et Rev.1 de *B. melitensis*, repose sur les critères suivants.

La souche B19 de *Brucella abortus* possède les caractéristiques classiques d'un biovar 1 de *B. abortus*, mais n'exige pas de CO₂ pour sa croissance, ne pousse pas en présence de benzylpénicilline (3 µg/ml soit 5 UI/ml), de bleu de thionine (2 µg/ml), et d'i-érythritol (1 mg/ml) (concentrations finales) et présente un taux élevé d'utilisation du L-glutamate (2). Dans certains cas, la souche 19 peut pousser en présence de i-érythritol mais sans l'utiliser.

La souche Rev.1 de *Brucella melitensis* possède les caractéristiques classiques d'un biovar 1 de *B. melitensis*, mais pousse plus lentement sur milieu ordinaire, ne pousse pas en présence de fuchsine basique, de thionine (20 µg/ml) ou de benzylpénicilline (3 µg/ml) (concentrations finales), mais pousse en présence de streptomycine à 2,5 ou 5 µg/ml (soit 5 UI/ml) (2, 20, 21, 24).

La souche RB51 de *Brucella abortus* présente les caractéristiques suivantes : morphologie rugueuse, croissance en présence de rifampicine (250 µg par ml de milieu) et impossibilité de production de chaîne polysidique O (OPS) (81). L'incapacité de production de chaîne O peut être démontrée par l'absence de réactivité des colonies de RB51 avec des anticorps monoclonaux (AcM) spécifiques de l'OPS en dot-blot ou en Western blot (77, 81). L'absence d'OPS peut également être démontrée indirectement par injection de 4×10^8 UFC de RB51 à des souris BALB/c puis recherche d'anticorps anti-OPS qui s'avère alors négative (81).

Les souches vaccinales B19, Rev.1 et RB51 peuvent être identifiées au moyen de PCR spécifiques (16, 80, 89, 91).



Légendes des figures

Figure A. Locus amplifiés prévus (rangées) pour diverses catégories d'échantillons (colonnes). A : les 4 locus de chaque catégorie sont montrés avec leurs sondes d'hybridation ; B : les produits prévus lors d'une amplification réussie (fs : souches de terrain de *B. abortus*).

Figure B. Profils caractéristiques d'amplification d'isolats bactériens bovins tels qu'ils sont détectés par électrophorèse en gel d'agarose. Piste 1 : souche de terrain de *B. abortus* ; piste 2 : souche B19 de *B. abortus* ; piste 3 : souche RB51 de *B. abortus* ; piste 4 : *Brucella spp.* (mais pas *B. abortus*) ; piste 5 : bactéries autres que *Brucella*. Un gel à 2 % d'agarose a été chargé avec 8 µl de produit amplifié et 1 µl de colorant dans chaque puits ; l'électrophorèse a été réalisée à 70 V pendant 2 h 30 ; la coloration a été faite avec du bromure d'éthidium et la visualisation sous UV.

2. Épreuves sérologiques

Aucune épreuve sérologique n'est, à elle seule, appropriée à toutes les situations épidémiologiques. Toutes les épreuves présentent des limites, notamment pour le diagnostic individuel (36, 68). On doit donc prendre en compte tous les facteurs pouvant influencer la valeur d'une épreuve et/ou des résultats d'une épreuve avant interprétation et application au diagnostic. Pour ce qui concerne le présent chapitre, les méthodes sérologiques décrites correspondent à des méthodes normalisées et validées et dont les performances permettent de les qualifier comme « épreuves prescrites » ou « épreuves alternatives » pour les échanges internationaux. Cela n'empêche pas l'utilisation de méthodes modifiées ou identiques, mais utilisant des réactifs différents. Cependant, les méthodes et réactifs décrits dans ce chapitre constituent un référentiel en ce qui concerne la performance diagnostique attendue des épreuves sérologiques.

On notera que l'épreuve de séroagglutination lente (SAW, *Serum Agglutination de Wright* ou SAT, *Serum Agglutination Test*) est généralement considérée comme non satisfaisante pour les échanges internationaux. La réaction de fixation du complément (FC) montre une spécificité diagnostique supérieure à celle de la SAW mais possède également un système normalisé de conversion des titres en unités. Les performances diagnostiques de certaines méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) et de polarisation de fluorescence (FPA) sont analogues voire supérieures à celles de la FC et, dès lors qu'elles sont plus robustes et techniquement plus simples à mettre en œuvre, leur emploi peut être préféré (64, 98). Les performances de plusieurs de ces épreuves ont été comparées.

Pour la surveillance de la brucellose à un niveau national ou régional, les épreuves à l'antigène tamponné de *Brucella* (BBATs pour *Buffered Brucella Antigen Tests*), c'est-à-dire l'épreuve du Rose Bengale (RB, dénommée plus communément épreuve à l'antigène tamponné ou EAT) et le BPAT (*Buffered Plate Agglutination Test*), de même que l'ELISA et le FPA, sont des épreuves de dépistage adéquates. Les sérums ayant présenté un résultat positif doivent être testés à nouveau en suivant une stratégie de confirmation adaptée.

Dans les autres espèces, comme les buffles (*Bubalus bubalis*), le bison américain ou européen (*Bison bison*, *Bison bonasus*), le yack (*Bos grunniens*), le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) et les chameaux (*Camelus bactrianus* et *C. dromedarius*), les camélidés d'Amérique du Sud, l'infection à *Brucella* sp. se déroule de manière analogue à celle des bovins. Les mêmes procédures sérologiques doivent être utilisées pour ces animaux (59), mais chaque épreuve doit être validée pour l'espèce considérée (33, 34).

• Sérums étalons de référence

Les sérums bovins étalons (de référence) primaire sont ceux auxquels doivent être comparés et étalonnés tous les autres sérums de référence. Ces sérums étalons sont tous disponibles dans les laboratoires nationaux de référence et doivent être utilisés pour établir les étalons secondaires ou nationaux contre lesquels des étalons de travail peuvent être préparés et utilisés en laboratoire de diagnostic pour l'usage quotidien en routine.

Ces sérums ont été produits et définis par l'OIE comme sérums étalons internationaux¹. L'utilisation de ces réactifs concourt à l'harmonisation internationale du diagnostic et de la normalisation des antigènes (98) :

- Pour le RB et la FC, le sérum international « OIE International Standard Serum » (OIEISS, précédemment dénommé « WHO Second International anti-*Brucella abortus* Serum » ou ISaBS) qui contient 1 000 UI agglutinantes et 1 000 UIFC (Unités internationales de fixation du complément) est utilisé.
- De plus, 3 sérums étalons OIE pour l'ELISA sont disponibles. Ils sont également d'origine bovine et comprennent un sérum étalon positif fort (OIEELISA_{SP}SS ; « SP » pour *strong positive*), un sérum positif faible (OIEELISA_{WP}SS ; « WP » pour *weak positive*) et un sérum étalon négatif (OIEELISA_NSS).

• Production des antigènes

La production d'antigènes de diagnostic doit toujours être effectuée à partir de la souche 99 de *Brucella abortus* (Weybridge S99) (voir note de bas de page n°1 pour l'adresse) ou de la souche 1119-3 de *B. abortus* (USDA) (S1119-3)². Les antigènes préparés à partir de l'une de ces souches sont également utilisés pour le diagnostic des infections à *B. melitensis* ou *B. suis*. Les souches doivent être entièrement lisses et ne doivent pas auto-agglutiner en solution saline isotonique ni en acriflavine à 0,1 % (p/v). Il doit s'agir de cultures pures présentant les caractéristiques de souches CO₂ indépendantes de *B. abortus*.

1 Disponible auprès du Laboratoire de référence de l'OIE pour la Brucellose suivant : Veterinary Laboratories Agency (VLA) Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, Royaume-Uni.

2 Disponible auprès de : United States Department of Agriculture (USDA), National Veterinary Services Laboratories (NVSL), 1800 Dayton Road, Ames, Iowa 50010, États-Unis d'Amérique.

biovar 1. Les semences originales devront servir à préparer un lot de semence, présentant les propriétés des souches originales et conservé par lyophilisation ou congélation en azote liquide.

Pour la production d'antigène, la semence est inoculée sur plusieurs pentes de gélose (infusion de pomme de terre) incubées ensuite à 37 °C pendant 48 h. Le SDA ou le TSA, additionnés de 5 % de sérum de cheval ou de veau foetal et/ou de 1 % d'extrait de levure constituent des milieux satisfaisants, pour autant que la semence utilisée respecte les exigences ci-dessus. Après contrôle de pureté de la culture, celle-ci est remise en suspension en PBS stérile (pH = 6,4). La suspension est inoculée sur de la gélose pomme de terre ou glycérol-dextrose en boîtes de Roux. Celles-ci sont incubées à 37 °C pendant 72 h face ensemencée vers le bas. Après contrôle de pureté de la culture par coloration de Gram d'échantillons de chaque boîte, les bactéries sont récoltées en ajoutant 50 à 60 ml de solution saline phénolée (phénol 0,5 % dans une solution à 0,85 % de chlorure de sodium) à chaque boîte. Les boîtes sont alors agitées doucement, la suspension décantée, et les bactéries inactivées par chauffage à 80 °C pendant 90 min. Après un contrôle de viabilité, l'antigène est entreposé à 4 °C.

Les bactéries peuvent également être produites par lots ou par culture continue en fermenteur (38), au moyen d'un milieu liquide contenant (par litre d'eau distillée) du D-glucose (30 g), une peptone de première qualité (30 g), de l'extrait de levure (Difco) (10 g), de l'orthophosphate de sodium (NaH_2PO_4 ; 9 g) et du phosphate disodique (Na_2HPO_4 ; 3,3 g). Le pH initial est de 6,6, mais il tend à augmenter jusqu'à 7,2 à 7,4 au cours du cycle de croissance. On doit prendre soin de vérifier la capacité des lots de peptone et d'extrait de levure utilisés à permettre une bonne croissance sans formation de cellules anormales ou dissociées. Une aération et une agitation vigoureuses sont indispensables pendant la croissance et un ajustement du pH entre 7,2 et 7,4 par l'addition d'HCl 0,1 M stérile peut s'avérer nécessaire. L'inoculum de semence est préparé comme décrit plus haut. La culture est incubée à 37 °C pendant 48 h. Les cycles de culture continue peuvent être mis en œuvre pour de plus longues périodes, mais un certain savoir-faire est nécessaire pour les maîtriser. Des contrôles en cours de production doivent être effectués sur la culture, que ce soit en milieu solide ou liquide, pour s'assurer de la pureté, de la production d'une quantité adéquate de bactéries viables et d'absence de dissociation vers des formes rugueuses. Les suspensions bactériennes utilisées pour la préparation de tous les antigènes doivent être vérifiées à l'étape de récolte pour ce qui est de la pureté et du caractère lisse.

La culture est récoltée par centrifugation, puis le culot remis en suspension en soluté salin phénolé (0,5 %). Les bactéries sont inactivées par chauffage 90 min à 80 °C puis entreposées à 4 °C. La suspension doit être stable en soluté salin isotonique et ne présenter aucun signe d'auto-agglutination. Un contrôle de viabilité est réalisé sur la suspension et aucune croissance ne doit être mise en évidence après 10 jours d'incubation à 37 °C. Le volume du « paquet » de cellules (PCV) des suspensions peut être déterminé par centrifugation d'un volume de 1 ml en tubes de Wintrobe pendant 75 min à 3 000 g.

a) Épreuves à l'antigène tamponné de *Brucella* (épreuves prescrites pour les échanges internationaux)

- **Épreuve du Rose Bengale (ou épreuve à l'antigène tamponné – EAT)**

Cette épreuve est une simple agglutination rapide utilisant un antigène coloré au rose Bengale et tamponné à un pH bas, habituellement $3,65 \pm 0,05$ (54).

- **Production de l'antigène**

L'antigène de l'EAT est préparé par centrifugation des cellules inactivées de *B. abortus* S99 or S1119-3 à 23 000 g pendant 10 min à 4 °C et remise en suspension homogène dans une solution saline phénolée stérile (0,5 %) à la concentration de 1 g pour 22,5 ml (N.B. : si du carboxyméthyl-cellulose sodique est utilisé comme agent de sédimentation pendant la préparation du concentré cellulaire, les résidus insolubles doivent être retirés par filtration de la suspension à travers un préfiltre AMF-CUNO Zeta-plus [Type CPR 01A] avant coloration). On ajoute 1 ml de Rose Bengale (CI N°45440) à 1 % (p/v) en eau distillée stérile pour 35 ml de cette suspension et le mélange placé mis sous agitation pendant 2 h à température ambiante. Le mélange est ensuite filtré à travers de l'ouate de coton et centrifugé à 10 000 g et le culot de cellules colorées est mis en suspension à la concentration de 1 g de cellules pour 7 ml de diluant (21,1 g d'hydroxyde de sodium dissous dans 353 ml de solution saline phénolée stérile, à laquelle sont ajoutés 95 ml d'acide lactique puis ajustement à 1056 ml en solution saline phénolée stérile). La couleur de cette suspension doit être d'un rose intense et le surnageant d'un échantillon centrifugé doit être exempt de colorant ; le pH doit être de $3,65 \pm 0,05$. Après filtration à travers de l'ouate de coton, la suspension est filtrée 2 fois à travers un préfiltre en fibre de verre de type Sartorius N°13430, et ajustée à un PCV d'environ 8 % et entreposée à 4 °C en l'absence de lumière, en attendant la normalisation finale contre l'OIEISS. L'antigène doit être conservé selon les recommandations du fournisseur et ne devrait en général pas être congelé.

Lorsqu'il est employé selon la procédure de référence, l'antigène d'EAT doit donner une réaction positive franche avec la dilution du 1/45 de L'OIEISS en soluté salin phénolé à 0,5 % mais pas avec celle du 1/55. Il est également souhaitable de comparer, sur un panel de sérums définis, la réactivité des nouveaux lots d'antigène avec des lots préalablement étalonnés.

- **Protocole**

- Ramener les échantillons de sérum et l'antigène à température ambiante ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$); seule la quantité nécessaire à une journée de travail doit être sortie du réfrigérateur.
- Déposer 25 à 30 μl de chaque échantillon de sérum sur une plaque blanche, émaillée ou plastique, ou dans une plaque à hémagglutination OMS.
- Agiter doucement le flacon d'antigène et déposer un volume égal d'antigène à côté de chaque dépôt de sérum.
- Dès que le dernier dépôt d'antigène est effectué, mélanger sérum et antigène complètement (au moyen d'un bâtonnet de verre ou plastique, changé pour chaque sérum) de manière à produire une zone circulaire ou ovale de 2 cm de diamètre environ.
- Le mélange est agité doucement pendant 4 min à température ambiante sur un agitateur basculant ou tridimensionnel (selon que la zone de réaction est ovale ou ronde, respectivement).
- Lire la réaction au bout de 4 min. Toute agglutination visible doit être considérée comme une réaction positive. Un sérum témoin donnant une réaction légèrement positive est utilisé à chaque série d'épreuves de manière à vérifier la sensibilité des conditions d'épreuve.

L'EAT est une épreuve très sensible. Cependant, comme pour toutes les autres épreuves sérologiques, on peut parfois observer des réactions positives à la suite d'une vaccination au B19 ou du fait de réactions sérologiques faussement positives (RSFP). Aussi, toute réaction positive doit-elle être confirmée selon une procédure appropriée (incluant la mise en œuvre d'autres épreuves et une enquête épidémiologique). Des réactions négatives par défaut sont rares et sont souvent liées à un phénomène de zone, aisément mis en évidence en diluant le sérum avant épreuve ou en testant de nouveau l'animal 4 à 6 semaines plus tard. Néanmoins, l'EAT est une épreuve adaptée à la surveillance pour le dépistage des troupeaux infectés ou pour garantir l'absence d'infection brucellique en troupeau indemne.

- **Épreuve d'agglutination en plaque tamponnée (BPAT - *Buffered plate agglutination test*)**

- **Production de l'antigène**

L'antigène de BPAT est préparé à partir de *B. abortus* S1119-3 conformément au protocole décrit par Angus et Barton (3).

Deux solutions de colorant sont nécessaires : le vert brillant (2 g/100 ml) et le cristal violet (1 g/100 ml) dissous en eau distillée. Une fois préparées, les deux solutions devront être conservées séparément pendant 24 h puis mélangées à volume égal dans un flacon coloré et entreposées au réfrigérateur au moins 6 mois avant utilisation. Le mélange colorant peut être alors utilisé entre 6 et 12 mois après préparation.

Le diluant tamponné est préparé par dissolution lente d'hydroxyde de sodium (150 g) dans 3 à 4 litres de soluté salin phénolé stérile. On ajoute 675 ml d'acide lactique à cette solution et le volume final est ajusté à 6 litres par addition de soluté salin phénolé stérile. Le pH de la solution doit être compris entre 3,63 et 3,67.

Les cellules de *B. abortus* S1119-3 sont remises en suspension à la concentration de 250 g par litre en solution saline phénolée. On ajoute 6 ml de colorant par litre de suspension cellulaire et le mélange est homogénéisé par agitation. Il est ensuite filtré au travers de coton absorbant stérile puis centrifugé à 10 000 *g* à 4 $^{\circ}\text{C}$. Le culot cellulaire est ensuite remis en suspension en diluant tamponné (comme décrit plus haut) à la concentration de 50 g pour 100 ml. Le mélange est agité énergiquement pendant 2 h puis dilué par addition de 300 ml de diluant tamponné pour 100 ml de suspension cellulaire (soit une concentration finale de 50 g de cellules pour 400 ml de diluant tamponné). Le mélange est laissé entre 20 et 24 h sous agitation à température ambiante puis la concentration cellulaire est ajustée à 11 % (p/v) en diluant tamponné. Cette suspension est laissée une nuit sous agitation avant utilisation. Dans l'attente des contrôles de qualité du produit final, l'antigène est entreposé à 4 $^{\circ}\text{C}$ jusqu'à utilisation. La durée de validité de cet antigène est d'un an. Il ne doit pas être congelé.

Le pH de l'antigène de BPAT doit être de $3,70 \pm 0,03$ et le pH du mélange sérum-antigène dans une proportion de 8 pour 3 doit être de $4,02 \pm 0,04$. La suspension cellulaire colorée à 11 % doit avoir un aspect bleu-vert. Chaque lot d'antigène de BPAT doit être contrôlé en testant au moins 10 sérums faiblement positifs en comparaison avec un ou plusieurs lots d'antigène précédents. Les lots d'antigène doivent, dans la mesure du possible, être comparés à l'antigène étalon préparé par les NVSL de l'USDA (voir note de bas de page n°2 pour l'adresse). Il n'existe aucune procédure de normalisation internationale utilisant l'étalon OIEISS.

- **Protocole**

- Amener doucement les sérums à tester et l'antigène à température ambiante ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) ; il convient de ne décongeler que la quantité d'antigène nécessaire aux épreuves de la journée.
- Bien agiter les échantillons. Distribuer 80 µl de chaque sérum à tester sur une plaque de verre divisée au marqueur en carrés de 4 cm × 4 cm.
- Bien homogénéiser le flacon d'antigène en le secouant doucement et distribuer 30 µl d'antigène à côté de chaque goutte de sérum à tester.
- Dès que la dernière goutte d'antigène a été déposée, mélanger soigneusement les sérums et l'antigène (utiliser une baguette de verre ou de plastique propre pour chaque sérum) afin de produire une zone circulaire d'environ 3 cm de diamètre.
- Une fois le mélange effectué, on applique 3 fois à la plaque un mouvement par inclinaison, de manière à obtenir un mélange homogène, puis on la place pendant 4 min. dans une chambre humide à température ambiante.
- La plaque est ensuite sortie et de nouveau agitée comme indiqué ci-dessus puis replacée en chambre humide pour 4 min.
- Lire immédiatement les résultats des réactions à la fin des 8 min d'incubation. Toute agglutination visible doit être considérée comme une réaction positive. Un sérum témoin donnant une réaction positive minimum doit être testé en début de chaque journée avant de commencer les réactions afin de vérifier la sensibilité du test.

Comme l'EAT, cette épreuve est très sensible et détecte aisément les anticorps induits par la vaccination. Aussi, toute réaction positive doit-elle être confirmée au moyen d'épreuves complémentaires. Des réactions négatives par défaut sont rares et sont souvent liées à un phénomène de zone, aisément mis en évidence en diluant le sérum avant épreuve ou en testant de nouveau l'animal plus tard.

b) Test de fixation du complément (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Bien qu'elle soit de mise en œuvre plus complexe, qu'elle nécessite un bon équipement de laboratoire et un personnel suffisamment entraîné au titrage précis et à l'entretien des réactifs, la FC est une épreuve très largement utilisée et acceptée comme épreuve de confirmation. De nombreuses variantes de la méthode existent mais la FC est plus volontiers mise en œuvre en microméthode. La fixation à chaud ou celle à froid peuvent être utilisées pour l'incubation du sérum, de l'antigène et du complément, soit, à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min ou à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 14 à 18 h. Le choix de la méthode doit prendre en compte plusieurs facteurs : l'activité anti-complémentaire des sérums de mauvaise qualité est plus fréquente avec la fixation à froid, alors qu'avec la fixation à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ les phénomènes de zone sont plus fréquents et plus intenses, ce qui oblige à tester davantage de dilutions de chaque sérum.

Plusieurs méthodes de FC ont été proposées qui utilisent des concentrations différentes de globules rouges de mouton (GRM), frais ou en milieu conservateur (une suspension à 2 %, 2,5 % ou 3 % est habituellement recommandée), sensibilisés avec un égal volume de sérum de lapin anti-GRM dilué de manière à contenir plusieurs fois (habituellement 2 à 5 fois) la concentration minimale requise pour induire la lyse à 100 % des GRM en présence d'une solution titrée de complément de cobaye. Cette dernière est titrée indépendamment (en présence ou en l'absence d'antigène selon la méthode) pour déterminer la quantité de complément, par unité de volume normalisée, nécessaire à la lyse de 50 % ou 100 % de GRM sensibilisés. Cette unité est définie comme l'unité hémolytique 50 % ou 100 % de complément (CH_{50} ou CH_{100}). Il est habituellement recommandé de titrer le complément avant chaque série d'épreuve, un titrage en tube étant impératif pour la détermination d'unités CH_{50} . En général, on utilise 1,25 à 2 CH_{100} ou 5 à 6 CH_{50} dans l'épreuve.

Le tampon salin au barbital (véronal) constitue le diluant de référence pour la FC. Il est habituellement préparé à partir de tablettes disponibles dans le commerce ; il peut aussi être préparé à partir d'une solution stock contenant du chlorure de sodium (42,5 g), de l'acide barbiturique (2,875 g), du diéthyl-barbiturate de sodium (1,875 g), du sulfate de magnésium (1,018 g) et du chlorure de calcium (0,147 g) pour 1 litre d'eau distillée. Cette solution stock est diluée dans 4 volumes de solution de gélatine à 0,04 % avant utilisation.

- **Production de l'antigène**

De nombreuses variantes de l'épreuve existent. Mais, quelle que soit la procédure choisie, l'épreuve doit utiliser un antigène préparé à partir d'une souche certifiée de *B. abortus*, telle que la S99 ou la S1119-3, et préalablement étalonné sur l'OIEISS. L'antigène de FC peut être préparé selon des procédures spéciales (2, 38). Mais on peut aussi utiliser un antigène constitué de cellules entières après dilution de la suspension stock de manière à obtenir un PCV d'environ 2 % avant normalisation sur l'OIEISS. L'antigène doit être étalonné de manière à obtenir une fixation à 50 % avec la dilution au 1/200 de l'OIEISS et une fixation complète à des concentrations plus élevées du sérum. En effet, une trop faible (ou trop importante)

concentration de l'antigène peut ne pas permettre une fixation complète pour des concentrations plus élevées du sérum. Lorsque deux concentrations de l'antigène sont convenables, la suspension la plus concentrée doit être choisie, pour éviter l'apparition de phénomènes de zone.

L'antigène dilué au 1/10 doit avoir un aspect homogène, dense, blanchâtre, sans agrégats ni dépôts visibles après incubation à 37 °C pendant 18 h. Il ne doit pas avoir d'effet anticomplémentaire à la dilution utilisée dans l'épreuve. L'antigène est entreposé à 4 °C et ne doit pas être congelé.

- **Protocole (exemple)**

Les échantillons de sérum purs et les sérums témoins appropriés doivent être décomplémentés en bain-marie à 60 °C ± 2 °C pendant 30 min. Si les sérums ont été préalablement dilués au 1/2 en tampon véronal ils doivent être décomplémentés à 58 °C ± 2 °C pendant 50 min. Habituellement, on ne teste en routine qu'une seule dilution de sérum (en général au 1/4 ou au 1/5 selon le protocole de FC choisi). Il est néanmoins recommandé de tester des dilutions sériées lors de contrôle pour un échange commercial de manière à identifier les phénomènes de zone.

La technique est habituellement mise en œuvre dans des microplaques de format 96 puits à fond rond (en U) de la façon suivante :

- i) On dépose 25 µl d'échantillon de sérum dilué décomplémenté dans la première, la seconde et la troisième rangée. La première rangée est utilisée pour le contrôle du pouvoir anticomplémentaire de chaque échantillon de sérum. 25 µl de tampon véronal sont ajoutés aux puits de la première rangée (sérums témoins) pour compenser l'absence d'antigène. On ajoute 25 µl de tampon à tous les autres puits sauf ceux de la seconde rangée. Des dilutions en série de rang 2 sont effectuées par transfert de 25 µl de sérum dilué de puits en puits à partir de la troisième rangée. On rejette enfin 25 µl du mélange obtenu dans la dernière rangée.
- ii) On dépose ensuite 25 µl d'antigène, à la dilution de travail, à chaque puits sauf ceux de la première rangée.
- iii) On ajoute enfin 25 µl de complément, contenant le nombre requis d'unités, à tous les puits.
- iv) Des puits témoins contenant seulement le diluant, le complément + le diluant, l'antigène + le complément + le diluant, sont préparés sous un volume de 75 µl pour chaque série d'épreuve. Un sérum témoin faiblement positif doit être inclus dans chaque série d'épreuves pour vérifier la sensibilité de la série.
- v) Les plaques sont incubées 30 min à 37 °C ou la nuit à 4 °C, et un volume (de 25 ou 50 µl selon la technique) de GRM sensibilisés est ajouté à chaque puits. Les plaques sont remises à incuber 30 min à 37 °C.
- vi) La lecture s'effectue après centrifugation des plaques à 1 000 *g* et 4 °C pendant 10 min ou après les avoir laissées au repos à 4 °C pendant 2 à 3 h pour permettre aux cellules de sédimenter. Le degré d'hémolyse est comparé à celui de puits témoins correspondant à 0, 25, 50, 75 et 100 % d'hémolyse. L'absence d'activité anticomplémentaire est vérifiée pour chaque sérum dans le puits de la première rangée.
- vii) Normalisation des résultats de FC :

Il existe un système d'unités fondé sur l'OIEISS. Ce sérum contient 1 000 UIFC (unités internationales de fixation du complément) par ml. Si, par exemple, dans une méthode donnée, ce sérum montre un titre de 200 (50 % d'hémolyse), alors, pour un sérum inconnu testé dans la même méthode, le nombre d'UIFC par ml est donné par la formule : $1\,000 \times 1/200 \times \text{titre du sérum (50 \% d'hémolyse)}$. L'OIEISS contient des IgG spécifiques. L'activité de fixation du complément des sérums étalons nationaux doit également dépendre de cet isotype. Des difficultés sont parfois rencontrées dans la normalisation du fait d'une FC sélective sur de différents isotypes d'immunoglobulines des différentes techniques. Aussi est-il recommandé que, dans chaque pays utilisant la FC, un agrément soit trouvé entre les différents laboratoires pour qu'ils utilisent la même méthode de FC de manière à garantir le même niveau de sensibilité. De manière à permettre des comparaisons entre pays, les résultats doivent toujours être exprimés en UIFC, calculés par référence à un sérum étalon, lui-même calibré par rapport à l'OIEISS.

- viii) *Interprétation des résultats* : Les sérums présentant un titre égal à 20 UIFC/ml ou plus sont considérés comme positifs.

La méthode décrite ici est un exemple, d'autres volumes et quantités de réactifs pouvant être choisis pourvu que l'épreuve soit calibrée sur l'OIEISS tel que décrit plus haut et que les résultats soient exprimés en UIFC/ml.

La FC est une épreuve très spécifique. Cependant, comme pour toutes les autres épreuves sérologiques, on peut parfois observer des réactions positives à la suite d'une vaccination au B19 ou du fait de RSFP. Aussi, toute réaction positive doit-elle être confirmée selon une procédure *ad hoc* (incluant la mise en œuvre d'autres épreuves et d'une enquête épidémiologique). Un seuil de positivité de la FC à 30 UIFC/ml est habituellement retenu pour les femelles vaccinées au B19 entre 3 et 6 mois et testées à partir de l'âge de 18 mois ou plus.

c) Méthodes immuno-enzymatiques (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

• ELISA Indirect

De nombreuses variantes de l'ELISA indirect (I-ELISA) utilisant différentes préparations antigéniques, différents conjugués anti-immunoglobuline-enzyme et substrats/chromogènes ont été décrites. Plusieurs kits de diagnostic commerciaux, validés à l'occasion d'études de terrain à grande échelle, sont disponibles et largement utilisés. Dans l'intérêt de la normalisation internationale, les trois sérums étalons ELISA de l'OIE doivent être utilisés par les laboratoires nationaux de référence pour l'évaluation et la calibration de la méthode ou kit de diagnostic utilisé.

L'épreuve doit être calibrée de manière à ce que la densité optique (DO) du sérum étalon OIE positif fort pour l'ELISA se situe à un niveau juste au-dessus du plateau sur la partie linéaire de la courbe dose-réponse typique. Le sérum étalon OIE positif faible pour l'ELISA doit invariablement donner un résultat se situant sur la partie linéaire de la même courbe dose-réponse, juste au-dessus du seuil de positivité. Le sérum étalon OIE négatif pour l'ELISA et le témoin blanc (tampon) doivent toujours donner des résultats en dessous du seuil de positivité (97). Le seuil doit être établi dans une population d'étude en utilisant une méthode appropriée de validation (voir Chapitre 1.1.4., « Principes de validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses »).

L'I-ELISA est une épreuve très sensible mais parfois incapable de distinguer les anticorps induits par une vaccination au B19 ou ceux liés aux RSFP des anticorps induits par des souches sauvages de *Brucella* (60). Aussi l'I-ELISA doit-il être considéré plus comme une méthode de dépistage qu'une épreuve de confirmation chez les bovins vaccinés ou dans les troupeaux connaissant des problèmes de RSFP.

Le problème avec les RSFP peut être surmonté en partie en réalisant l'i-ELISA avec comme antigène soit le LPS-R soit des antigènes du cytosol ou en employant des réactifs chimiques chaotropique comme le thiocyanate de potassium. La plupart des RSFP résulte de réactions croisées avec une fraction du polysaccharide-O de la molécule de LPS-S (pour *smooth lipopolysaccharide*) ; les réactions croisées avec des régions centrales du LPS sont moins fréquentes (57).

Pour les i-ELISA destinés au dépistage, l'antigène devrait être préparé à partir du lipopolysaccharide de phase lisse (LPS-S). Plusieurs protocoles permettent d'obtenir un antigène adéquat.

Des anti-immunoglobulines monoclonales (AcM) ou polyclonales ou un conjugué d'une enzyme avec la protéine A/G selon la disponibilité et les exigences de performance des kits peuvent être utilisés. Un AcM spécifique de la chaîne lourde des IgG₁ bovines confère une meilleure spécificité à l'épreuve, aux dépens parfois d'une baisse de sensibilité, tandis qu'un conjugué d'une enzyme avec la protéine A/G peut se révéler un réactif utile pour tester une grande variété d'espèces de mammifères (57, 67).

La méthode décrite ci-dessous est un exemple de méthode validée au plan international et qui a été largement utilisée dans le cadre de projets de recherche et de coopération technique soutenus par des fonds internationaux.

Le tampon d'adsorption de l'antigène est un tampon carbonate/bicarbonate 0,05 M, de pH 9,6, composé de bicarbonate de sodium (2,93 g) et de carbonate de sodium (1,59 g) (azide de sodium [0,20 g/litre] optionnel) dans 1 litre d'eau distillée. Le diluant du conjugué et des échantillons de sérums est du PBS 0,01 M, de pH 7,2, composé de phosphate de sodium dibasique (1,4 g), de phosphate de potassium monobasique (0,20 g), de chlorure de sodium (8,50 g) et de Tween 20 à 0,05 % dans 1 litre d'eau distillée (PBS). Ce tampon est aussi utilisé comme tampon de lavage.

Le conjugué utilisé dans cet exemple est un AcM de la chaîne lourde des IgG₁ bovines conjugué à la peroxydase de raifort (HRPO pour Horseradish peroxidase). La solution stock de substrat est de l'eau oxygénée à 3 %. La solution stock de chromogène est constituée d'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzthiazoline-6-sulphonique) 0,16 M (ABTS) en eau distillée. Le tampon du substrat est du tampon citrate, de pH 4,5, composé de citrate trisodique dihydraté (7,6 g) et d'acide citrique (4,6 g) dissous dans

1 litre d'eau distillée. La solution d'arrêt de la réaction enzymatique est du lauryl sulfate de sodium (SDS) à 4 %.

- **Production de l'antigène (exemple)**

Le LPS-S de *B. abortus* S1119-3 ou S99 est préparé par chauffage de 5 g en poids sec (ou 50 g en poids humide) de cellules en suspension dans 170 ml d'eau distillée à 66 °C puis on ajoute 190 ml de phénol 90 % (v/v) phénol à 66 °C. Le mélange est agité en continu à 66 °C pendant 15 min, refroidi et centrifugé à 10 000 *g* pendant 15 min à 4 °C. Le phénol brunâtre en culot est retiré au moyen d'une longue canule et les gros débris cellulaires par filtration (au moyen d'un filtre Whatman No. 1), si nécessaire.

Le LPS-S est précipité par l'addition de 500 ml de méthanol froid contenant 5 ml de méthanol saturé par l'acétate de sodium. Après 2 h d'incubation à 4 °C, le précipité est retiré par centrifugation à 10 000 *g* pendant 10 min. Le précipité est mis sous agitation dans 80 ml d'eau distillée pendant 18 h puis centrifugé à 10 000 *g* pendant 10 min. Le surnageant est placé à 4 °C. Le précipité est remis en suspension dans 80 ml d'eau distillée et la suspension obtenue agitée pendant 2 h à 4 °C. Le surnageant est récupéré par centrifugation comme ci-dessus et mélangé avec le surnageant précédemment récolté.

Ensuite, 8 g d'acide trichloracétique sont ajoutés aux 160 ml de LPS brut. Après agitation pendant 10 min, le précipité est récupéré par centrifugation et le surnageant translucide est dialysé contre de l'eau distillée (deux changements d'au moins 4 litres chacun) puis lyophilisé.

Le LPS lyophilisé est pesé puis reconstitué à la concentration de 1 mg/ml en tampon carbonate 0,05 M, de pH 9,6, puis soniqué en bain glacé, à environ 6 watts, trois fois 1 min. Le LPS est ensuite lyophilisé en aliquots de 1 ml puis conservé à température ambiante.

- **Protocole (exemple)**

- Le LPS-S lyophilisé est reconstitué dans 1 ml d'eau distillée puis dilué au 1/1 000 (ou à une dilution prédéterminée par titrage sur les sérums étalons OIE pour l'ELISA) en tampon carbonate 0,05 M, de pH 9,6. Pour l'adsorption sur les microplaques, 100 µl de LPS-S dilué sont déposés dans tous les puits, puis les plaques sont couvertes et incubées pendant 18 h à 4 °C. Après incubation, les plaques peuvent être utilisées ou scellées, congelées et conservées à -20 °C pendant 1 an. Les plaques sont décongelées à 37 °C, 30 à 45 min avant utilisation.
- L'antigène non adsorbé est éliminé par 4 lavages successifs de tous les puits au PBS. On dépose 100 µl de sérum dilué entre le 1/50 et le 1/200 en PBS, à pH 6,3, contenant 7,5 mM d'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) et 7,5 mM d'acide éthylène glycol tétracétique (EGTA) (PBS/EDTA) dans les puits et on incube à température ambiante pendant 30 min.
- Les échantillons de sérums sont testés seuls ou en double. Les témoins, calibrés sur les sérums étalons de l'OIE pour l'ELISA, sont testés en double et comprennent un sérum témoin positif fort, un sérum positif faible et un sérum négatif ainsi qu'un témoin blanc (tampon).
- Les composants du sérum n'ayant pas réagi sont ensuite retirés par 4 lavages successifs au PBS (le PBS contenant de l'EDTA/EGTA est proscrit car il inactive l'enzyme HRPO). On dépose ensuite 100 µl de conjugué (AcM M23, spécifique de la chaîne lourde des IgG₁ bovines, conjugué à l'HRPO) dilué en PBS (dilution prédéterminée par titrage) dans chaque puits et les plaques sont incubées à température ambiante pendant 30 min.
- Le conjugué n'ayant pas réagi est éliminé par 4 lavages successifs. On dépose ensuite 100 µl de substrat/chromogène (H₂O₂ 1,0 mM [100 µl/20 ml tampon citrate] et ABTS 4 mM [500 µl/20 ml tampon citrate]) dans chaque puits, et la plaque est agitée pendant 10 min. Le développement de la couleur est mesuré au spectrophotomètre à 414 ou 405 nm. Si nécessaire, 100 µl de SDS à 4 % sont rajoutés dans chaque puits pour arrêter la réaction.
- Les puits témoins contenant le sérum témoin positif fort sont considérés comme positifs à 100 % et tous les résultats sont établis en référence à la DO de ces puits témoins (entre 1 000 et 1 800) par l'équation :

$$\text{Pourcentage de positivité (\%P)} = \text{DO (échantillon)} / \text{DO (témoin positif fort)} \times 100$$

L'antigène LPS-S, de petites quantités de l'AcM spécifique de la chaîne lourde des IgG₁ bovines, le programme pour la génération de données à partir de certains spectrophotomètres et un mode opératoire de référence pour l'I-ELISA sont disponibles à des fins de recherche ou de normalisation³.

Lorsqu'on utilise ce mode opératoire ou un protocole similaire pour l'I-ELISA avec un calibrage sur les sérums étalons de l'OIE pour l'ELISA telle que décrite plus haut, la sensibilité diagnostique doit être égale ou supérieure à celle des BBATs chez les bovins infectés et la spécificité diagnostique doit être équivalente à celle de la FC chez les bovins non vaccinés (66, 67). Chez les bovins vaccinés au B19 et ceux affectés par des RSFP on peut s'attendre à une spécificité diagnostique plus faible qu'avec la FC, variable selon le niveau où est placé le seuil de positivité de l'I-ELISA.

• ELISA de compétition

L'ELISA de compétition (C-ELISA) qui utilise un AcM spécifique de l'un des épitopes de la chaîne O (OPS pour polysaccharide O) des *Brucella* sp. a été rapporté comme présentant une spécificité supérieure à celle de l'I-ELISA (49, 64, 83, 92). Ceci a été obtenu par la sélection d'un AcM de plus grande affinité que les anticorps de réaction croisée. Cependant, il a été aussi rapporté que ce C-ELISA n'élimine pas toutes les réactions (FPSR) liées aux bactéries croisant au plan antigénique (61). Le C-ELISA est également capable d'empêcher la plupart des réactions dues aux anticorps résiduels liés à la vaccination par le B19. Le choix de l'AcM dont l'affinité et la spécificité sont uniques, a une influence spécifique sur les performances diagnostiques de l'épreuve. Comme toute épreuve basée sur un AcM, la très large disponibilité de l'AcM ou de l'hybridome doit aussi être prise en compte pour son acceptabilité au plan international et son utilisation à large échelle.

Plusieurs variantes du C-ELISA ont été décrites. Des kits de C-ELISA sont disponibles dans le commerce. Dans l'intérêt de la normalisation internationale, les 3 sérums étalons ELISA de l'OIE doivent être utilisés par les laboratoires nationaux de référence pour l'évaluation et l'étalonnage de la méthode.

L'épreuve doit être calibrée de manière à ce que la DO du sérum étalon OIE positif fort pour l'ELISA se situe à un niveau juste au-dessus du plateau sur la partie linéaire de la courbe dose-réponse typique (proche de l'inhibition maximale). Le sérum étalon OIE positif faible pour l'ELISA doit donner un résultat se situant sur la partie linéaire de la même courbe dose-réponse juste au-dessus du seuil de positivité (soit une inhibition modérée). Le sérum étalon OIE négatif pour l'ELISA et le témoin blanc (tampon/AcM) doivent toujours donner des résultats en dessous du seuil de positivité (inhibition minimale).

La méthode décrite ci-dessous est un exemple de méthode validée au plan international et qui a été largement utilisée dans le cadre de projets de recherche et de coopération technique soutenus par des fonds internationaux.

Les tampons sont identiques à ceux décrits pour l'I-ELISA.

• Production de l'antigène (exemple)

Le LPS-S de *B. abortus* S1119-3 est préparé et utilisé de la même manière que pour l'I-ELISA.

• Protocole (exemple)

- i) Le LPS lyophilisé est reconstitué dans 1 ml d'eau distillée puis dilué au 1/1 000 en tampon carbonate 0,05 M, de pH 9,6. Pour l'adsorption sur les microplaques, 100 µl de LPS dilué sont déposés dans tous les puits, puis les plaques sont couvertes et incubées pendant 18 h à 4 °C. Après incubation, les plaques peuvent être utilisées ou scellées, congelées et conservées à -20 °C pendant 1 an. Les plaques sont décongelées à 37 °C pendant 30 à 45 min avant utilisation.
- ii) L'antigène non adsorbé est éliminé par 4 lavages successifs de tous les puits au PBS. On dépose ensuite 50 µl d'AcM (M84 dans cet exemple) à la dilution appropriée en PBS/EDTA dans tous les puits, suivis immédiatement par 50 µl de sérum dilué au 1/10 en PBS/EDTA. Les plaques sont incubées à température ambiante pendant 30 min sous agitation pendant les trois premières minutes.
- iii) Les échantillons de sérums sont testés seuls ou en double. Les témoins, calibrés sur les sérums étalons de l'OIE pour l'ELISA, sont testés en double et comprennent un sérum témoin positif fort, un sérum positif faible et un sérum négatif ainsi qu'un témoin blanc (tampon).
- iv) Les composants du sérum n'ayant pas réagi et l'AcM sont ensuite retirés par 4 lavages successifs au PBS. 100 µl d'anticorps commercial de chèvre anti-IgG de souris (chaînes H et L) conjugué à l'HRPO

3 Disponible au Laboratoire de référence de l'OIE pour la Brucellose : the Animal Diseases Research Institute, 3851 Fallowfield Road, Nepean, Ontario K2H 8P9, Canada.

dilué en PBS (dilution prédéterminée par titrage) sont déposés dans chaque puits et les plaques sont incubées à température ambiante pendant 30 min.

- v) Le conjugué n'ayant pas réagi est éliminé par 4 lavages successifs. 100 µl de substrat/chromogène (H_2O_2 1,0 mM et ABTS 4 mM) sont déposés dans chaque puits, la plaque est agitée pendant 10 min. Le développement de la couleur est mesuré au spectrophotomètre à 414 ou 405 nm. Si nécessaire, 100 µl de SDS à 4 % sont rajoutés dans chaque puits pour stopper la réaction.
- vi) Les puits témoins contenant l'AcM et le tampon (pas de sérum) sont considérés comme donnant une inhibition nulle (0 %) et tous les résultats sont établis en référence à la DO de ces puits témoins (entre 1 000 et 1 800) par l'équation :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%I)} = 100 - (\text{DO [échantillon]}/\text{DO [témoin positif fort]} \times 100)$$

L'antigène LPS-S, des petites quantités d'AcM ainsi que le programme pour la génération de données à partir de certains spectrophotomètres et un mode opératoire de référence pour le C-ELISA sont disponibles à des fins de recherche ou de normalisation (voir note de bas de page 3 pour l'adresse).

Lorsqu'on utilise ce mode opératoire ou un protocole similaire pour le C-ELISA avec un calibrage sur les sérums étalons de l'OIE pour l'ELISA, la sensibilité diagnostique doit être équivalente à celle des BBATs et de l'I-ELISA chez les bovins infectés (63, 64, 66) et la spécificité diagnostique doit être équivalente ou supérieure à celle de la FC et de l'I-ELISA chez les bovins non vaccinés ou ceux affectés par des RSFP. La spécificité diagnostique est supérieure à celle de la FC et de l'I-ELISA spécialement chez les bovins vaccinés au B19.

d) Test de polarisation de fluorescence (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Le test de polarisation de fluorescence (FPA) est une technique simple de mesure de l'interaction antigène/anticorps et peut être mise en œuvre au laboratoire ou sur le terrain. C'est une épreuve en phase homogène dans laquelle les analytes ne sont pas séparés et qui est donc très rapide.

Le principe de l'épreuve est fondé sur la rotation aléatoire des molécules en solution. La taille moléculaire est le facteur influençant le plus le taux de rotation, qui lui est inversement relié. Ainsi, une petite molécule tourne-t-elle plus vite qu'une grosse molécule. Si une molécule est conjuguée à un fluorochrome, la vitesse de rotation au travers d'un angle de 68,5° peut être déterminée par la mesure de l'intensité de lumière polarisée dans les plans vertical et horizontal. Ainsi, une grosse molécule émet-elle plus de lumière dans un plan unique (plus polarisée) qu'une petite molécule tournant plus vite et émettant plus de lumière dépolarisée.

Pour la plupart des tests FPA, on ajoute au sérum ou tout autre fluide à analyser pour la recherche d'anticorps, un antigène de petite masse moléculaire, moins de 50 kDa, conjugué à un fluorochrome. Si des anticorps sont présents, l'association à l'antigène conjugué va diminuer le taux de rotation et cette diminution peut être mesurée.

Pour le diagnostic de la brucellose, un fragment de petite masse moléculaire (en moyenne 22 kDa) de l'OPS du LPS-S de *B. abortus* (souche 1119-3) conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) est utilisé comme antigène. Cet antigène est ajouté au sérum dilué ou au sang total la mesure du taux d'anticorps est obtenu en environ 2 min (pour le sérum) ou 15 s (pour le sang) après l'ajout de l'antigène au moyen d'un lecteur de polarisation de fluorescence (62, 66).

Le test FPA peut être mis en œuvre en tubes de verre ou en microplaques 96 puits. Le sérum bovin est dilué au 1/10 pour la réaction en microplaque ou au 1/100 pour la réaction en tube ; si on utilise du sang recueilli sur EDTA, la dilution doit être de 1/50 pour la réaction en tube et de 1/5 pour la réaction en microplaque (le recueil sur héparine entraîne une plus grande variabilité de l'épreuve). Le diluant utilisé est du Tris 0,01 M (1,21 g), contenant, par litre d'eau distillée, du chlorure de sodium 0,15 M (8,5 g), de l'Igepal CA630 (précédemment NP40) à 0,05 % (500 µl) et de l'EDTA 10 mM (3,73 g), pH 7,2 (tampon Tris). Une première lecture pour évaluer la dispersion de lumière est effectuée après mélange au moyen du lecteur de polarisation de fluorescence (FPM). On ajoute de l'antigène conjugué correctement titré (donnant habituellement une intensité de 250 000 à 300 000), on mélange et une seconde lecture est réalisée au moyen du FPM environ 2 min plus tard pour du sérum et 15 sec pour le sang. Un résultat (en unités de millipolarisation, mP) au-dessus du seuil établi indique une réaction positive. Le seuil classique est de 90 à 100 unités mP, mais l'épreuve doit être calibrée localement vis-à-vis des sérums étalons de l'OIE pour l'ELISA. Des témoins, positif fort, positif faible et négatif, de même que du sérum d'animal vacciné au B19 doivent être inclus dans l'épreuve.

- **Production de l'antigène (exemple)**

De l'OPS de *B. abortus* S1119-3, est préparé par l'addition de 400 ml d'acide acétique à 2 % (v/v) à 5 g de cellules en poids sec (ou 50 g en poids humide), puis par un autoclavage de la suspension à 121 °C pendant 15 min, puis par le retrait des débris cellulaires après centrifugation à 10 000 **g** pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant est ensuite traité par 20 g d'acide trichloracétique de manière à précipiter les protéines et les acides nucléiques. Le précipité est retiré après centrifugation à 10 000 **g** pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant est dialysé contre au moins 100 volumes d'eau distillée puis lyophilisé.

On dissout 3 mg d'OPS dans 0,6 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 M (NaOH 4 g/litre) et la solution est incubée à 37 °C pendant 1 h. On ajoute ensuite 0,3 ml d'isomère 1 de FITC 1 à la concentration de 100 mg/ml en diméthyl-sulfoxyde et on incube de nouveau à 37 °C pendant 1 h. L'OPS conjugué est ensuite déposé sur une colonne de 1 × 10 cm remplie de DEAE (diéthyl-aminoéthyl) Sephadex A 25 équilibrée par du tampon phosphate 0,01 M de pH 7,4. La première fraction (après passage de 10 à 15 ml de tampon) est de couleur vert vif, et après son passage le tampon est remplacé par du phosphate 0,1 M, de pH 7,4. Ceci permet l'élution de 10 à 15 ml de tampon, suivie de 25 à 40 ml de produit vert fluorescent. Ce dernier produit constitue l'antigène utilisé dans le FPA. La préparation d'antigène peut être augmentée proportionnellement.

La quantité d'antigène utilisée par épreuve est déterminée par dilution du produit ci-dessus jusqu'à obtention sur le FPM d'une intensité de fluorescence totale de 250 000 à 300 000.

L'antigène peut être conservé sous forme liquide pendant plusieurs années à 4 °C ou lyophilisé, dans les deux cas en flaconnage coloré.

Des petites quantités d'antigène conjugué à des fins de recherche ou de normalisation et des modes opératoires pour la préparation d'antigène et pour le test de FPA sont disponibles (voir note de bas de page 3 pour l'adresse).

- **Protocole**

- On dépose 1 ml de tampon Tris en tube de verre de borosilicate 10 × 75 mm puis 10 µl de sérum ou 20 µl de sang recolté sur EDTA. Pour les plaques à 96 puits, 20 µl de sérum sont ajoutés à 180 µl de tampon. Il est important de bien mélanger. Une lecture est effectuée sur le FPM pour évaluer la dispersion de lumière.
- Un volume d'antigène, dont l'intensité de fluorescence totale est de 250 à 300 × 10³, est ajouté dans le tube et l'ensemble est alors bien mélangé. Ce volume est variable de lot à lot, mais il est généralement de 10 µl. Une seconde lecture est effectuée sur le FPM après incubation à température ambiante pendant environ 2 min pour le sérum et 15 s pour le sang recueilli sur EDTA.
- Un résultat au-dessus du seuil établi préalablement indique une réaction positive.
- Les témoins de travail suivants, calibrés vis-à-vis des sérums étalons de l'OIE pour l'ELISA, doivent être inclus dans chaque série d'épreuves : un positif fort, un positif faible et un négatif.

La sensibilité et la spécificité diagnostiques du FPA pour la brucellose bovine sont analogues à celles du C-ELISA. La spécificité diagnostique pour des bovins récemment vaccinés au B19 est supérieure à 99 % (62). Cependant, la spécificité du FPA en population affectée par des RSFP est actuellement inconnue. Le FPA doit être normalisé de manière à ce que les sérums étalons OIE positif fort et positif faible donnent systématiquement un résultat positif.

3. Autres épreuves

a) Épreuve cutanée allergique à la brucelline

L'épreuve cutanée allergique à la brucelline est une épreuve immunologique alternative, utilisable pour le dépistage des troupeaux non vaccinés, pourvu qu'un allergène purifié (sans trace de LPS-S) et normalisé (tel que la Brucelline-INRA) soit utilisé.

L'épreuve cutanée allergique à la brucelline dispose d'une spécificité très élevée qui permet de considérer comme infecté tout bovin non vacciné et séronégatif mais ayant réagi à l'épreuve cutanée allergique (78). Aussi, cette épreuve est-elle d'une grande aide pour l'interprétation des réactions sérologiques positives supposées être des RSFP liées à des bactéries croisant au plan antigénique, en zone indemne tout particulièrement (23, 74, 78).

Certains animaux infectés ne présentent pas de réaction positive, ce qui conduit à ne pas recommander cette épreuve comme épreuve unique de diagnostic ou pour le contrôle aux échanges internationaux.

Il est impératif d'utiliser une préparation de brucelline définie et normalisée, ne contenant pas de LPS-S. Autrement, il pourrait induire des réactions inflammatoires non spécifiques ou interférer avec les épreuves sérologiques mises en œuvre par la suite. La Brucelline-INRA qui est préparée à partir d'une souche rugueuse de *B. melitensis* répond à ces exigences et une préparation commerciale équivalente est disponible⁴.

- **Protocole**

- i) 0,1 ml de brucelline est injecté en intradermique dans le pli caudal, la peau du flanc ou sur le côté de l'encolure.
- ii) La lecture est effectuée après 48 à 72 h.
- iii) L'épaisseur de la peau au point d'injection est mesurée au cutimètre à ressort avant injection et lors de la lecture.
- iv) Une réaction fortement positive est aisément identifiée par l'apparition d'une tuméfaction et d'une induration locales. Cependant, les réactions moyennes requièrent un examen attentif. Un épaissement cutané de 1,5 à 2 mm doit être interprété comme une réaction positive.

Bien que l'épreuve cutanée allergique à la brucelline soit l'une des épreuves les plus spécifiques en brucellose (chez les animaux non-vaccinés), le diagnostic ne devra pas se limiter à l'observation d'un très faible nombre de réactions positives dans le troupeau, mais prendre également en compte les résultats des épreuves sérologiques. L'inoculation intradermique de brucelline peut induire une anergie temporaire (baisse de la réponse cellulaire). Aussi est-il généralement recommandé de laisser un intervalle de 6 semaines entre deux épreuves sur le même animal.

Sur des veaux vaccinés avec la souche RB51, l'épreuve cutanée réalisée avec la brucelline RB51 homologue induit une réponse humorale anamnétique. Ainsi, l'association de l'épreuve cutanée avec la RB51 et de la FC avec l'antigène RB51 constitue-t-elle un système diagnostique permettant l'identification des animaux individuels vaccinés avec la RB51 (23).

b) Épreuve de séroagglutination lente

Bien qu'elle ne soit reconnue, ni comme épreuve prescrite, ni comme épreuve alternative, la séroagglutination lente (dite « de Wright » ou SAW) a été utilisée avec succès pendant de nombreuses années à l'occasion de programmes de surveillance et d'éradication de la brucellose bovine. Sa spécificité est singulièrement améliorée par l'addition d'EDTA à l'antigène (35, 48, 65).

L'antigène est constitué d'une suspension bactérienne en soluté salin phénolé (NaCl 0,85 % [p/v] et phénol 0,5 % [v/v]). Le formol ne doit pas être utilisé. Les antigènes peuvent être fournis sous forme concentrée pourvu que le facteur de dilution à utiliser soit indiqué sur l'étiquette du flacon. De l'EDTA peut être ajouté à la suspension antigénique à 5 mM en dilution finale d'épreuve pour réduire le taux de réactions faussement positives. Le pH de la suspension antigénique doit alors être réajusté à 7,2.

L'OIEISS contient 1 000 unités internationales (UI) agglutinantes. L'antigène doit être préparé indépendamment de la concentration cellulaire mais sa sensibilité doit être étalonnée de manière à produire une agglutination de 50 % avec l'OIEISS en dilution finale allant du 1/600 au 1/1 000 ou de 75 % à la dilution finale allant du 1/500 au 1/750. Il est également recommandé de comparer la réactivité d'un nouveau lot d'antigène avec celle d'anciens lots au moyen d'un panel de sérums définis.

L'épreuve est mise en œuvre en tubes ou en microplaques. Le mélange de l'antigène et des dilutions sériques doit être incubé pendant 16 à 24 h à 37 °C. Si l'épreuve est réalisée en microplaques, l'incubation peut être raccourcie à 6 h. Trois dilutions au moins sont préparées pour chaque sérum, de manière à identifier le cas échéant un phénomène de zone. Les dilutions d'un sérum suspect sont établies de telle manière que la réaction au seuil de positivité se situe dans le tube médian (ou puits médian dans la microméthode).

Interprétation des résultats : Le degré d'agglutination obtenu avec un sérum donné est exprimé en UI par ml. Un sérum contenant 30 UI par ml ou plus est considéré comme positif.

4 Brucellergène OCB[®], Synbiotics Europe, 2 rue Alexander Fleming, 69007 Lyon, France.

c) Épreuves à l'haptène natif ou au Poly B

Les épreuves à l'haptène natif ou au Poly B sont des épreuves de confirmation⁵ qui ont été utilisées avec succès dans un programme d'éradication en association avec l'EAT comme épreuve de dépistage (4). La sensibilité optimale est obtenue dans un système d'immunodiffusion radiale inverse (RID) dans lequel le sérum diffuse dans un gel hypertonique contenant le polyoside (24, 43). Néanmoins, la procédure de double diffusion en gel est également utile (46, 47). Les veaux vaccinés par voie sous-cutanée avec la dose de référence de B19 à l'âge de 3 à 5 mois sont négatifs 2 mois après vaccination. Les bovins adultes vaccinés 4 à 5 mois plus tôt par voie sous-cutanée avec la dose réduite de B19 ne sont positifs que s'ils se sont infectés et excrètent le vaccin dans leur lait (43). La vaccination conjonctivale (chez le jeune ou l'adulte) réduit le délai nécessaire pour obtenir un résultat négatif avec les épreuves à l'haptène natif ou au Poly B. La corrélation entre résultat positif et excrétion de *Brucella* est une caractéristique notable du RID. Ceci a été montré aussi bien chez des bovins expérimentalement infectés que chez des animaux naturellement infectés sous traitement antibiotique (42). Les épreuves à l'haptène natif ou avec des protéines cytosol permettent aussi d'éliminer la plupart des RSFP dues à *Yersinia enterocolitica* O:9 et les RSFP d'origine inconnue (57).

d) Tests sur le lait

L'épreuve de l'anneau (ou ring-test ; RT) sur lait de mélange est un excellent outil de dépistage pour les troupeaux laitiers. Les prélèvements de lait de ce type peuvent être obtenus à moindre coût et plus fréquemment que les prélèvements de sang et sont souvent centralisés dans les laiteries. Lors de résultat positif, il est nécessaire de mettre en œuvre une épreuve sur le sang à partir des vaches ayant contribué au mélange de lait concerné. L'I-ELISA sur le lait est une épreuve sensible et spécifique particulièrement adaptée aux très grands troupeaux. Le RT est une bonne méthode lorsque l'I-ELISA n'est pas disponible.

- **I-ELISA sur le lait**

Comme pour le sérum, de nombreuses variantes de l'I-ELISA sur le lait sont utilisées. Plusieurs kits de diagnostic commerciaux validés à l'occasion d'études de terrain à grande échelle sont disponibles et largement utilisés. Dans l'intérêt de la normalisation internationale, les trois sérums étalons ELISA de l'OIE doivent être utilisés par les laboratoires nationaux de référence pour l'évaluation et le calibrage de la méthode ou kit de diagnostic utilisé. L'I-ELISA doit être calibré de manière à ce que la densité optique (DO) du sérum étalon OIE positif fort pour l'ELISA dilué au 1/125 en sérum négatif puis au 1/10 en lait négatif donne systématiquement un résultat positif. Les échantillons de laits de mélanges sont généralement testés à des dilutions plus faibles que les sérums, soit purs, soit du 1/2 au 1/10 en tampon diluant, le reste de l'épreuve étant mis en œuvre de manière identique à l'épreuve décrite pour le sérum. Le C-ELISA ne doit pas être utilisé pour l'épreuve sur lait entier mais être réservé au lactosérum.

- **Épreuve de l'anneau sur le lait**

Le RT peut être utilisé sur les animaux en lactation pour le dépistage de la brucellose. Dans les grands troupeaux (> 100 vaches en lactation), l'épreuve devient moins sensible. Pour les échantillons de lait qui sont obtenus à partir du lait mélangé de grands troupeaux, le RT peut être ajusté pour compenser le facteur de dilution. Les échantillons sont ajustés en appliquant la formule suivante : pour les troupeaux de moins de 50 vaches, employer 1 ml de lait de mélange ; pour les troupeaux de 150 à 450 vaches, employer 2 ml de lait ; pour les troupeaux de 451 à 700 vaches, employer 3 ml de lait. Des réactions faussement positives peuvent apparaître chez les bovins vaccinés depuis moins de 4 mois, sur des échantillons contenant un lait anormal (tel que du colostrum) ou en cas de mammite. Aussi, l'épreuve n'est-elle pas recommandée dans les très petits troupeaux où ces événements ont un effet notable sur la qualité des résultats des tests.

- **Production de l'antigène**

L'antigène de RT est préparé à partir d'une suspension concentrée de cellules tuées des souches S99 ou S1119-3 de *B. abortus*, produites comme décrit précédemment. La suspension est centrifugée, par exemple, à 23 000 *g* pendant 10 min à 4 °C, puis les cellules remises en suspension dans une solution colorante à l'hématoxyline. Plusieurs protocoles satisfaisants sont utilisables; un exemple est donné ci-après : 100 ml d'hématoxyline (CI N°75290) à 4 % (p/v) en éthanol à 95 % sont ajoutés à une solution de sulfate d'aluminium et d'ammonium (5 g) dans 100 ml d'eau distillée et 48 ml de glycérol. 2 ml d'iodate de sodium à 10 % (p/v) fraîchement préparé sont ajoutés à la solution. Après un repos de 30 min à température ambiante, la solution violet foncé est ajoutée à 940 ml d'une solution de sulfate d'aluminium et d'ammonium à 10 % (p/v) en eau distillée. Le pH de ce mélange est ajusté à 3,1 et la solution doit être vieillie par stockage à température ambiante et à l'obscurité pendant 45 à 90 jours.

5 Le protocole détaillé peut être obtenu auprès du laboratoire pour la brucellose, Centro de Investigacion y Tecnologia Agroalimentaria/Gobierno de Aragón, Apartado 727, 50080 Zaragoza, Espagne.

Avant utilisation, la solution colorante est agitée et filtrée à travers de la laine de coton. Le « paquet » de cellules est remis en suspension dans la solution colorante à raison de 1 g pour 30 ml de colorant et l'ensemble maintenu à température ambiante pendant 48 h (certains laboratoires préfèrent à la place chauffer à 80 °C pendant 10 min). Les cellules colorées sont ensuite recueillies par centrifugation et lavées 3 fois dans une solution de chlorure de sodium (6,4 g), d'acide lactique à 85 % (1,5 ml) et d'hydroxyde de sodium à 10 % (4,4 ml) dans 1,6 litres d'eau distillée, pH final de 3,0. Les cellules lavées sont remises en suspension à raison de 1 g dans 27 ml de diluant constitué de soluté salin phénolé (0,5 %), ajusté à pH 4,0 par l'ajout d'acide citrique 0,1 M (2,5 ml environ) et de phosphate de sodium dibasique 0,5 M (1 ml environ). La suspension est maintenue à 4 °C pendant 24 h. Le mélange est filtré à travers de la laine de coton, le pH contrôlé et le PCV est mesuré et ajusté à environ 4 %.

La sensibilité du nouveau lot doit être comparée à un lot déjà étalonné en utilisant un panel d'échantillons présentant des degrés variés de réactivité et préparé en diluant un sérum positif dans du lait. L'antigène doit être normalisé contre l'OIEISS de manière à ce que sa dilution au 1/500 donne une réaction positive et sa dilution au 1/1 000 une réaction négative. L'antigène doit être conservé selon les recommandations du fournisseur, mais en général il devrait être conservé à 4 °C.

Le pH de l'antigène doit être compris entre 3,3 et 3,7 et sa couleur doit être d'un bleu foncé. Des traces de colorant libre sont possibles dans le surnageant d'un échantillon d'antigène centrifugé. Lorsque l'antigène est mélangé à du lait d'animal indemne, la colonne de lait doit présenter une coloration uniforme sans dépôt et la couche de crème ne doit pas présenter de coloration.

• Protocole

L'épreuve est mise en œuvre sur des échantillons de lait de mélange de citerne. Si nécessaire, les échantillons peuvent être additionnés d'agents de conservation (formol 0,1 % ou bronopol 0,02 %) et conservés 2 à 3 jours entre 3 et 4 °C avant épreuve.

- i) Amener doucement les échantillons de lait et l'antigène à température ambiante (20 °C ± 3 °C) ; il convient de ne sortir du réfrigérateur que la quantité d'antigène nécessaire aux épreuves de la journée.
- ii) Agiter doucement mais soigneusement le flacon d'antigène.
- iii) L'épreuve est réalisée en ajoutant 30 à 50 µl d'antigène à 1 à 2 ml de lait entier (le volume de lait peut être augmenté pour les échantillons de troupeaux de grande taille – voir ci-dessus « Épreuve de l'anneau sur le lait »).
- iv) La hauteur de la colonne de lait dans le tube doit être d'au moins 25 mm. Les échantillons de lait ne doivent pas avoir été congelés, ni chauffés, ni agités violemment ou conservés depuis plus de 72 h.
- v) Les mélanges lait/antigène sont habituellement incubés à 37 °C pendant 1 h, en même temps que des témoins de travail positif et négatif. Néanmoins, une incubation supplémentaire d'une nuit à 4 °C augmente la sensibilité de l'épreuve et rend la lecture de la réaction plus aisée.
- vi) Toute coloration bleue à l'interface du lait et de la crème doit être considérée comme un résultat effectivement positif, particulièrement dans les grands troupeaux.
- vii) Le résultat est considéré comme négatif si la couleur de la colonne de lait est plus intense que celle de la couche de crème.
- viii) Quand l'épreuve de l'anneau sur le lait est ajusté pour les grands troupeaux (2 à 3 ml de lait), 0,1 ml de crème de mélange négative est ajouté dans le tube suivi de 30 à 50 µl d'antigène pour test de l'anneau. Après mélange, le test est incubé et la lecture est réalisée de la même manière que pour une épreuve non ajustée. La crème de mélange négative est collectée à partir de lait non pasteurisé provenant d'un troupeau de 25 vaches ou plus, troupeau négatif vis-à-vis de la brucellose.

e) Test de l'interféron gamma

Au fur et à mesure que la prévalence de la brucellose diminue, la précision des épreuves sérologiques devient de plus en plus importante. Les réactions faussement positives (RSFP) entraînent des recherches épidémiologiques longues et coûteuses. Les épreuves qui éliminent les RSFP deviennent donc plus nécessaires. En règle générale, le test à l'interféron gamma implique la stimulation des lymphocytes du sang total à l'aide d'un antigène approprié ; en l'occurrence, la Brucelline s'est révélée efficace ce qui permet la mesure de l'interféron gamma produit par un ELISA de capture (44, 93, 94). Ce protocole de l'épreuve est utile dans la détection des RSFP chez les moutons (25) et les porcs (76).

f) Détection des anticorps dirigés contre les *Brucella* en phase rough

L'utilisation de souche rugueuse de *Brucella* (RB51) comme vaccin ainsi que certaines infections par des *Brucella* atypiques ont nécessité des tests sérologiques permettant de détecter les anticorps dirigés contre la partie centrale du LPS-S. Bien que le LPS-S de *B. abortus* RB51 contiennent de petites quantités de OPS (19), la réponse humorale vis-à-vis de l'OPS est en général négligeable et le LPS-R constitue un meilleur antigène. Le LPS-R est facilement extrait de *B. abortus* RB51 par la méthode de Galanos *et al.* (32). Cet antigène peut alors être utilisé dans un I-ELISA (66, 67). En utilisant la bactérie totale comme antigène, la réaction de FC s'est révélée aussi capable de détecter des anticorps anti-LPS-R (1).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

La brucellose est l'une des infections les plus faciles à contracter au laboratoire et des précautions de sécurité strictes doivent être observées. Toute manipulation de cultures vivantes de *Brucella*, y compris des souches vaccinales, est dangereuse et doit être effectuée à un niveau de confinement 3 ou plus comme cela est recommandé dans le Chapitre 1.1.2., afin de minimiser les risques professionnels.

C1. Brucelline

La Brucelline-INRA est un extrait de la souche rugueuse B115 de *B. melitensis*, exempt de LPS. Cette préparation n'induit pas d'anticorps décelable dans les épreuves à l'antigène tamponné de *Brucella* (BBATs), la FC ou l'ELISA.

1. Gestion de la semence bactérienne**a) Caractéristiques de la semence bactérienne**

La production de Brucelline-INRA repose sur un système de lot de semence tel que décrit pour les antigènes et les vaccins. La semence originale de la souche B115 de *B. melitensis* pour la production de brucelline⁶ doit être mise en culture de manière à produire un lot de semence, conservé par lyophilisation ou congélation dans l'azote liquide. La semence doit posséder les propriétés d'une culture pure de la souche rugueuse B115 de *B. melitensis* et ne doit produire aucune colonie lisse de *Brucella* (avec LPS). Elle doit produire des quantités raisonnables d'antigènes protéiques réagissant avec des sérums anti-*Brucella* R ou S.

b) Méthode de culture (2)

La souche B115 de *B. melitensis* pousse préférentiellement dans le milieu liquide décrit plus haut pour la culture en fermenteur. La culture peut être réalisée par la méthode des lots, en continu, en fermenteur ou sous agitation en boîtes de Roux. Des contrôles de pureté doivent être effectués à chaque récolte et les bactéries doivent être en phase rugueuse.

c) Validation comme réactif de diagnostic in vivo

Des études de laboratoire et des essais de terrain réalisés en France ont confirmé que la Brucelline-INRA ne présente aucun effet nocif ni toxique et que son activité est spécifique. La préparation contient 50 à 75 % de protéines, essentiellement de faible masse moléculaire et 15 à 30 % d'hydrates de carbone. Elle ne contient aucun antigène de LPS. La Brucelline-INRA ne provoque aucune réaction inflammatoire chez des animaux non-sensibilisés et n'est pas en elle-même un agent sensibilisant. Elle n'induit pas d'anticorps décelable dans les épreuves sérologiques de référence en brucellose. Plus de 90 % des petits ruminants infectés par *B. melitensis* manifestent une hypersensibilité retardée à la Brucelline-INRA à un moment donné. La préparation n'est pas recommandée comme outil de diagnostic individuel, mais peut être très utile pour la surveillance et le dépistage des troupeaux. Elle est injectée par voie intradermique aux petits ruminants à la dose de 100 µg et provoque une réaction d'hypersensibilité retardée visible en 48 à 72 h chez les animaux sensibilisés. Des réactions positives sont observées tant chez les animaux infectés que chez les animaux vaccinés (78).

6 Disponible auprès de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, 37380 Nouzilly, France.

2. Méthode de fabrication (2)

Les cellules de la souche B115 de *B. melitensis* sont inactivées après culture par chauffage à 70 °C pendant 90 min, puis refroidies à 4 °C et récoltées par centrifugation à 9 000 *g* pendant 15 min à 4 °C. Les cellules sont lavées en eau distillée froide, déshydratées par précipitation dans 3 volumes d'acétone à –20 °C, puis laissées au repos à –20 °C pendant 24 à 48 h. Après un nouveau lavage en acétone froide, suivi d'un rinçage final en éther diéthylique, les cellules sont séchées sur du chlorure de calcium et maintenues à 4 °C. Les cellules séchées subissent alors un contrôle de viabilité. Elles sont ensuite remises en suspension dans du chlorure de sodium à 2,5 % à la concentration finale de 5 % (p/v) puis laissées pendant 3 jours sous agitation à 4 °C. Les cellules bactériennes sont retirées par centrifugation comme ci-dessus. Le surnageant est alors concentré à un quart de volume par ultrafiltration sur une membrane Diaflo PM10 (Amicon) et précipité par l'addition de 3 volumes d'éthanol glacé. Le mélange est maintenu à 4 °C pendant 24 h et le précipité est recueilli par centrifugation, dissous à nouveau en eau stérile et dialysé pour retirer l'éthanol. Après centrifugation à 105 000 *g* pendant 6 h à 4 °C, le surnageant, correspondant à la brucelline non normalisée, fait l'objet de mesures du contenu en protéines et carbohydrates. Il peut être lyophilisé directement comme matériau vrac ou après répartition finale.

3. Contrôles en cours de fabrication

L'extrait brut de brucelline doit être contrôlé en stérilité après l'extraction à l'acétone, pour s'assurer de l'inactivation des cellules de *Brucella* puis, une nouvelle fois, à la fin du processus pour éliminer une éventuelle contamination. Le pH et la concentration protéique doivent être mesurés et des tests d'identité doivent être réalisés sur le matériau vrac avant répartition finale.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les préparations d'allergène doivent être contrôlées en stérilité selon la méthode décrite au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Des échantillons de brucelline des récipients finaux doivent être soumis au test de stérilité de référence. La présence d'une toxicité anormale doit également être recherchée sur les préparations de brucelline. Pour cela, des doses équivalentes à 20 fois la dose bovine (2 ml) sont injectées par voie intrapéritonéale à 2 cobayes normaux, n'ayant pas été exposés préalablement à des *Brucella*. 5 souris normales sont également inoculées par voie sous-cutanée avec 0,5 ml de la brucelline à tester. Les animaux sont régulièrement examinés pendant 7 jours et aucune réaction locale ni générale ne doit être observée à la suite de l'injection.

L'absence de pouvoir dermonécrotique est vérifiée par l'injection de 0,1 ml du produit à tester dans le flanc préalablement rasé et désinfecté de 3 cobayes albinos n'ayant pas été exposés préalablement à des *Brucella* ou leurs antigènes. Aucune réaction cutanée ne doit être observée. L'absence de sensibilisation allergique ou sérologique est vérifiée par inoculation intradermique de 3 cobayes albinos, 3 fois à 5 jours d'intervalle, par 0,1 ml d'une dilution au 1/10 de la préparation à vérifier. Une quatrième injection similaire est effectuée 15 jours plus tard sur les mêmes 3 animaux et sur un lot témoin de 3 cobayes du même poids n'ayant reçu aucune injection préalable. Les animaux ne doivent montrer aucune séroconversion dans les épreuves de référence de brucellose (EAT, FC) sur un échantillon de sérum prélevé 24 h après la dernière injection ni aucun développement d'hypersensibilité retardée.

c) Activité

L'activité des préparations de brucelline est déterminée par l'injection intradermique de doses progressives de brucelline à des cobayes préalablement sensibilisés 1 à 6 mois auparavant par inoculation sous-cutanée de 0,5 ml de brucelline de référence⁷ en adjuvant complet de Freund. Les réactions érythémateuses sont visualisées et mesurées après 24 h et le titre est calculé par comparaison avec la brucelline de référence⁸. Cette méthode n'est valable que pour la comparaison de brucellines préparées selon le même

7 Un étalon national français de référence de la brucelline a été produit par l'INRA-PII (F-37380 Nouzilly, France) et est disponible auprès du Laboratoire de référence de l'OIE pour la Brucellose, AFSSA, 23 avenue du Général-de-Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France.

8 Le protocole de calcul statistique est disponible auprès du Laboratoire de référence de l'OIE pour la Brucellose, AFSSA, 23 avenue du Général-de-Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France.

protocole que l'allergène de sensibilisation. La normalisation initiale d'un lot d'allergène et la sensibilisation et le titrage chez des ruminants sont décrits dans la référence (2).

d) Durée de la sensibilisation

La durée de la sensibilisation est inégale. Le degré d'hypersensibilité à la brucelline varie considérablement d'un animal à l'autre. Les animaux peuvent ne manifester aucune hypersensibilité à l'injection de brucelline dans les tout premiers stades de l'infection ou lors d'infection ancienne.

e) Stabilité

La préparation lyophilisée conserve une pleine activité pendant plusieurs années. La préparation commerciale liquide conserve son niveau d'activité pendant la durée de validité préconisée.

f) Agents de conservation

L'emploi d'agents de conservation n'est pas recommandé pour les préparations lyophilisées. Pour la forme liquide, le merthiolate de sodium (au plus 0,1 mg/ml) peut être utilisé comme agent de conservation. Les préparations lyophilisées ne doivent être reconstituées que pour une utilisation immédiate.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

La Brucelline n'est pas toxique. Néanmoins elle peut provoquer des réactions sévères d'hypersensibilité chez les personnes sensibilisées exposées accidentellement. On prendra soin d'éviter les injections accidentelles ou la contamination des muqueuses. Les récipients usagés et le matériel d'injection doivent être soigneusement décontaminés ou éliminés par incinération dans un conteneur jetable.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Un test de stérilité doit être mis en oeuvre par la méthode recommandée. Les tests d'innocuité *in vivo* sont ceux décrits pour le contrôle de lot (voir Section C1.4.b). Ces tests sur lot peuvent ne pas être réalisés s'ils le sont sur le lot final avant répartition.

b) Activité

Celle-ci est vérifiée par l'injection d'une dose unique à des cobayes, selon la procédure décrite en Section C1.4.c.

C2. Vaccins

Vaccin *Brucella abortus* B19

Le vaccin *Brucella abortus* B19 est le vaccin utilisé le plus largement pour la prévention de la brucellose bovine et demeure le vaccin de référence auquel tout autre vaccin doit être comparé. C'est un vaccin vivant, délivré classiquement aux jeunes femelles âgées de 3 à 6 mois en dose sous-cutanée de $5 \text{ à } 8 \times 10^{10}$ unités formant colonie (UFC). Une dose réduite de 3×10^8 à 3×10^9 UFC peut être administrée par voie sous-cutanée aux bovins adultes, mais certains animaux développent par la suite des anticorps persistants, peuvent avorter et excréter la souche vaccinale dans le lait (84). En revanche, le vaccin peut être administré aux bovins de tous âges par voie conjonctivale en deux inoculations successives à la dose de $5 \text{ à } 10 \times 10^9$ UFC. Cette modalité induit une protection sans production d'anticorps persistants et réduit les risques d'avortement et d'excrétion dans le lait.

Le vaccin *Brucella abortus* B19 induit une bonne immunité contre une épreuve virulente moyenne. Le vaccin doit être préparé à partir d'une souche dérivée de la semence mère de l'USDA (voir note de bas de page 2 pour l'adresse). Chaque lot doit subir un contrôle de pureté (absence de micro-organismes exogènes), de viabilité (bactéries vivantes par dose) et de dissociation de phase. Les lots de semence du vaccin B19 doivent être régulièrement contrôlés pour leur virulence résiduelle et leur immunogénicité sur souris.

Les procédures de contrôle concernant ce vaccin sont décrites plus loin.

Vaccin *Brucella abortus* RB51

Depuis 1996, le vaccin *B. abortus* RB51 est devenu dans plusieurs pays le vaccin officiel pour la prévention de la brucellose bovine (82). Cependant son efficacité comparée à celle du B19 et son innocuité demeurent controversées (55, 56, 84, 85, 87). La méthode d'administration du vaccin varie légèrement selon les pays. Aux États-Unis, les veaux sont vaccinés par voie sous-cutanée entre 4 et 12 mois d'âge à la dose de $1 \text{ à } 3,4 \times 10^{10}$ UFC de RB51. La vaccination des bovins âgés de plus de 12 mois est mise en œuvre uniquement sous autorisation expresse des services officiels fédéraux de santé animale et la dose recommandée est de $1 \text{ à } 3 \times 10^9$ UFC de RB51 (70, 86). Dans d'autres pays, on recommande de vacciner les veaux (4 à 12 mois d'âge) à la dose de $1 \text{ à } 3,4 \times 10^{10}$ UFC, avec une revaccination à partir de 12 mois à la même dose pour induire un effet rappel et une immunité accrue (79, 82).

Chez les femelles en gestation, des avortements peuvent survenir lors de l'utilisation de la souche B19 (52, 58). Aux États-Unis, une étude sur la vaccination chez des animaux adultes avec une dose de 10^9 UFC de la souche RB51 n'a pas montré une augmentation significative du nombre des avortements dans les conditions de terrain (71). Les deux souches, RB51 et B19, ont été isolées du lait de vaches après vaccination (58, 72, 73, 79). Des études comparatives des vaccins avec B19 et RB51, ont montré que lorsque des veaux étaient vaccinés avec B19 puis vaccinés à l'âge adulte avec B19 ou RB51, le pourcentage des animaux qui excrétaient la souche vaccinale dans le lait était plus grand, et sur des périodes plus longues, chez les animaux vaccinés avec B19 que chez ceux vaccinés avec RB51 (71, 73, 79). L'utilisation d'un vaccin B19 pour adulte dans des troupeaux infectés par *Brucella* a réduit le nombre des avortements chez les animaux en phase aiguë mais pas en phase chronique de l'infection, et a contribué à l'éradication dans les troupeaux fortement touchés (6). Des informations épidémiologiques semblables concernant la vaccination des adultes avec la souche RB51 n'ont pas été rapportées. Au vu de ces observations, il convient d'utiliser judicieusement les vaccins B19 ou RB51 pour la vaccination des vaches en gestation (72).

Il est à souligner que le vaccin B19 peut infecter l'homme et provoquer une fièvre ondulante si aucun traitement n'est administré (95). Les études sur l'infection humaine par RB51 sont limitées, mais il semble que les risques de développer une fièvre ondulante dans ce cas soient minimes en comparaison de l'infection par B19 (5, 86, 91). Le diagnostic d'une infection produite par le RB51 requiert des tests spécifiques non disponibles dans la plupart des hôpitaux. Les « *Centers for Disease Control, Department of Health and Human Services* », Atlanta, Georgia, USA (CDC) ont mis en place une surveillance passive des inoculations accidentelles de RB51 dans leur pays de manière à établir si le vaccin est associé à une maladie chez l'homme. Cette étude a inclus 26 participants exposés au vaccin au cours de la vaccination animale. Le nombre de patients avec effets secondaires rapportés dans cette étude (vingt six) est faible lorsqu'on le rapporte au nombre d'actes de vaccination (plusieurs millions de veaux vaccinés) et au nombre prévisible d'inoculations de RB51 par inadvertance (8 pour 11 000). Le rapport indique qu'un traitement antibiotique approprié devrait protéger contre l'infection, mais on ne sait pas qui de la souche vaccinale ou d'autres composants du vaccin est à l'origine de ces effets secondaires (5). Ceci contraste avec le vaccin B19 pour lequel l'induction d'une fièvre ondulante par exposition accidentelle en l'absence de traitement préventif est bien documentée. Les médecins devant prendre des décisions sur le traitement après exposition accidentelle à la souche RB51 devraient être informés que cette souche vaccinale est hautement résistante à la rifampicine, l'un des antibiotiques de choix dans le traitement de la brucellose chez l'homme.

Les procédures de contrôle concernant ce vaccin sont décrites plus loin.

Vaccin *Brucella melitensis* Rev.1

Il n'est pas rare d'isoler *B. melitensis* chez les bovins dans les pays où la prévalence de cette infection chez les petits ruminants est élevée (90). L'efficacité protectrice du B19 contre l'infection bovine à *B. melitensis* a fait l'objet de débats et on a émis l'hypothèse que Rev.1 serait un vaccin plus efficace dans ces conditions. À ce jour, un seul rapport à ce jour démontre la capacité du B19 à contrôler *B. melitensis* sur le terrain (42, 88). En revanche aucune expérimentation n'a été conduite qui démontre l'efficacité de Rev.1 contre l'infection bovine à *B. melitensis*. De plus, l'innocuité de ce vaccin chez les bovins est pratiquement inconnue (8, 90).

Jusqu'à ce que l'innocuité du Rev.1 chez les bovins de différents stades physiologiques soit démontrée et que des études d'efficacité contre *B. melitensis* en conditions strictement contrôlées soient conduites, ce vaccin ne peut être recommandé chez les bovins.

1. Gestion de la semence bactérienne

a) Caractéristiques de la semence bactérienne

La semence originale de *Brucella abortus* B19 doit être obtenue pour la production de vaccin auprès de l'USDA (voir note de bas de page 2 pour l'adresse), et utilisée pour produire un lot de semence conservé par lyophilisation ou par congélation à la température de l'azote liquide. Les propriétés du lot de semence doivent correspondre à celles d'une culture pure d'une souche CO₂-indépendante de *B. abortus* biovar 1

mais sensible à la benzylpénicilline, au bleu de thionine et à l'i-érythritol aux concentrations recommandées et d'une faible pathogénicité pour le cobaye.

La semence originale de *Brucella abortus* RB51 est disponible commercialement pour la production de vaccin⁹. Ces compagnies sont détentrices de droits sur ce vaccin.

b) Méthode de culture

La souche B19 de *Brucella abortus* est cultivée, pour la production de vaccin, sur milieu sans sérum et sans autre produit animal, dans des conditions similaires à celles décrites plus haut pour *B. abortus* S99 ou S1119-3 (2).

La souche RB51 de *Brucella abortus* est cultivée par une méthode semblable.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

De nombreuses études indépendantes ont confirmé l'efficacité du B19 dans la protection des bovins contre la brucellose. Lorsqu'il est administré aux bovins impubères, il présente une virulence atténuée. Dans de rares cas, il peut être à l'origine d'une infection localisée au tractus génital. Des réponses anticorps persistant jusqu'à 6 mois ou plus sont susceptibles de survenir chez une proportion notable de bovins vaccinés à l'âge adulte par voie sous-cutanée à la dose de référence. Certains bovins vaccinés jeunes peuvent développer par la suite des arthropathies, de l'articulation fémoro-tibiale notamment (10, 22). Le vaccin est sans danger pour la plupart des animaux inoculés entre 3 et 6 mois d'âge. Il peut aussi être utilisé chez l'adulte à dose réduite. Il produit une immunité de longue durée contre des épreuves virulentes modérées à *B. abortus*, mais la durée précise de l'immunité conférée est inconnue. La durée de protection contre *B. melitensis* est inconnue. La souche vaccinale est stable et le retour à la forme virulente est extrêmement rare. Ce retour a été associé à l'apparition de souches utilisant l'i-érythritol après inoculation par inadvertance à des animaux gestants. Il présente une virulence atténuée pour la souris et des inoculums, même importants, sont rapidement éliminés des tissus.

Des rapports tant d'infections expérimentales que d'essais terrain ont conclu à l'efficacité de la souche RB51 de *B. abortus* dans la protection des bovins contre la brucellose. La souche présente une virulence atténuée tant chez le veau que chez le bovin adulte. Du fait de son expression minimale de LPS, la souche RB51 de *B. abortus* n'induit pas de séroconversion contre le LPS-S chez les animaux vaccinés. De plus, le RB51 n'induit pas d'anticorps contre l'antigène OPS détectable dans les procédures sérologiques habituelles (86). Il produit une immunité contre des épreuves virulentes modérées, mais la durée précise de l'immunité conférée est inconnue. La souche vaccinale est très stable et aucune réversion à la phase lisse n'a été décrite tant *in vivo* qu'*in vitro*. La souche présente une virulence atténuée pour de nombreuses espèces animales, y compris la souris, chez laquelle elle est rapidement éliminée des tissus.

Les vaccins B19 et RB51 présentent un certain pouvoir pathogène pour l'homme et des infections peuvent survenir après inoculation accidentelle. Des précautions doivent donc être prises pour leur préparation et leur manipulation et les étiquettes du récipient de produit fini doivent comporter un signal de danger. Dans tous les cas, les inoculations accidentelles doivent faire l'objet d'un traitement antibiotique approprié (voir Section C2.4.g).

2. Méthode de fabrication

Les procédures décrites plus haut peuvent être utilisées pour la production du vaccin B19. Cependant les cellules sont remises en suspension en PBS, pH 6,3, et récoltées par centrifugation ou par l'addition de carboxyméthyl-cellulose sodique à la concentration finale de 1,5 g/litre. La récolte à partir d'un cycle de fermentation ou le pool de cellules récoltées à partir des cultures en boîtes de Roux ensemencées au même moment avec la même semence constituent une récolte individuelle. On peut mélanger plusieurs récoltes individuelles pour former un lot vrac final ensuite réparti en récipients finaux d'un lot de vaccin. Avant mélange, chaque récolte individuelle doit subir un contrôle de pureté, de concentration cellulaire, de dissociation et d'identité. Une série analogue de contrôles doit être mise en œuvre sur le lot vrac final, dont le dénombrement cellulaire devra donner de 8 à 24×10^9 UFC/ml. Les ajustements de concentration sont faits par l'addition de PBS pour les vaccins destinés à être délivrés sous forme liquide ou par l'addition du produit stabilisant pour les vaccins lyophilisés. Si un produit stabilisant doit être utilisé, la perte de viabilité lors de la lyophilisation doit être prise en compte et ne doit pas excéder 50 %. Le produit fini desséché ne doit pas être exposé à une température excédant 35 °C durant le séchage et l'humidité résiduelle doit être de 1 à 2 %. Le récipient doit être scellé sous vide d'air ou en azote sec immédiatement après séchage puis conservé à 4 °C.

La procédure de production de la souche RB51 de *B. abortus* est très semblable à celle utilisée pour B19.

⁹ Colorado Serum Company, 4950 York Street, P.O. Box 16428, Denver, Colorado 80216-0428, USA ; ou Veterinary Technologies Corporation, 1872 Pratt Drive, Suite 1100B, Blacksburg, Virginia 24060, USA.

3. Contrôles en cours de fabrication

Le vaccin *Brucella abortus* B19 doit subir un contrôle de pureté et de dissociation de phase durant la préparation des récoltes individuelles. La concentration en cellules à la fin de la production en vrac doit aussi être contrôlée. Ceci peut être fait par la mesure de l'opacité, mais un dénombrement des cellules viables doit au moins être réalisé sur les lots de produit fini réparti. Leur identité est également vérifiée par agglutination avec un sérum anti-antigène A de *Brucella*. Le dénombrement du contenu des récipients finaux ne doit pas être inférieur à 50×10^9 UFC par dose de référence après lyophilisation et 95 % des cellules au moins doivent être en phase lisse.

Le vaccin *Brucella abortus* RB51 doit subir un contrôle de pureté et de phase durant la préparation des récoltes individuelles. La concentration en cellules des vrac doit aussi être contrôlée. Un dénombrement des cellules viables doit être réalisé sur les lots de produit fini réparti. Le dénombrement du contenu des récipients finaux doit être de $1 \text{ à } 3,4 \times 10^{10}$ UFC de RB51 par dose (dose sous-cutanée de 2 ml) et 100 % des cellules doivent être en phase rugueuse. Toutes les colonies doivent donner un résultat négatif aux tests de « dot-blot » avec des AcM spécifiques de l'antigène OPS.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests pour le contrôle des produits biologiques en matière de stérilité et d'absence d'organismes contaminants sont précisés au Chapitre 1.1.9.

b) Innocuité

Le vaccin B19 est un produit virulent en soi et il doit conserver une virulence minimale pour être efficace (voir Section C2.4.c). Néanmoins, un contrôle d'innocuité n'est pas nécessaire en routine. Si nécessaire, lorsqu'un nouveau processus de fabrication est mis en place et lorsqu'une modification de l'innocuité de la préparation vaccinale est attendue, on peut le réaliser sur bovin. Ce contrôle doit être réalisé comme suit : l'épreuve nécessite 12 génisses âgées de 4 à 6 mois. 6 jeunes femelles sont inoculées avec 1 ou 3 fois la dose recommandée. Chaque lot de 6 génisses est entretenu séparément. Tous les animaux sont mis sous observation pendant 21 jours. Aucune réaction locale ou générale ne doit apparaître. Si, pour une dose et une voie d'administration données, ce test donne de bons résultats sur un lot représentatif du vaccin, il n'est alors pas nécessaire de le répéter en routine sur les lots de semence ou les lots de produit fini préparés avec la même semence d'origine et selon le même processus de fabrication. Un test d'innocuité du B19 peut aussi être réalisé sur cobayes. Des groupes d'au moins 10 animaux sont soumis à des injections intramusculaires de doses de vaccins diluées en PBS, pH 7,2, de manière à contenir 5×10^9 UFC. Les animaux ne doivent pas manifester d'effets secondaires et aucune mortalité ne doit être observée.

Il n'y a pas de test d'innocuité réalisé en routine sur le vaccin *B. abortus* RB51. Si nécessaire, 1×10^8 UFC sont inoculées à des souris Balb/c de 8 à 10 semaines d'âge par voie intrapéritonéale et les rates sont mises en culture 6 semaines après inoculation. Les rates ne doivent contenir aucune colonie de RB51 et les souris ne doivent avoir développé aucun anticorps anti-OPS décelable.

c) Activité

• Vaccin B19

Un vaccin B19 est considéré comme efficace s'il possède les caractéristiques de la souche originale B19 et qu'il répond donc aux exigences en matière d'identité, de dissociation de phase, d'immunogénicité et de virulence résiduelle (9). Les lots doivent également être contrôlés pour ce qui concerne le nombre de bactéries viables.

• Identité

Le vaccin B19 reconstitué ne doit pas contenir d'organismes contaminants. Les *Brucella abortus* présentes dans le vaccin sont identifiées au moyen des tests morphologiques, sérologiques et biochimiques adéquats et par culture : *Brucella abortus* B19 possède les propriétés d'un biovar 1 de *B. abortus*, mais n'exige pas d'enrichissement en CO_2 de l'atmosphère pour sa croissance, ne pousse pas en présence de benzylpénicilline ($3 \mu\text{g/ml} = 5 \text{ UI/ml}$), de bleu de thionine ($2 \mu\text{g/ml}$) et d'i-érythritol (1 mg/ml) (toutes concentrations finales).

- **Dissociation de phase (caractère lisse)**

Le vaccin B19 reconstitué en eau distillée est ensemencé sur 6 boîtes de gélose (gélose sérum-dextrose ou trypticase-soja [TSA] additionnée de sérum 5 % [v/v] ou d'extrait de levure 0,1 % [p/v]) de manière à obtenir des zones de croissance confluentes ainsi que des zones avec des colonies bien isolées ou semi-isolées. Des différences légères d'aspect sont plus aisément mises en évidence sur les colonies adjacentes que celles bien séparées. Les boîtes sont mises à incuber à 37 °C pendant 5 jours et examinées en transillumination oblique (méthode de Henry) avant et après coloration (3 boîtes) au cristal violet (méthode de coloration de White & Wilson). En outre, la souche B19 est sensible à la rifampicine.

Aspect des colonies avant coloration : les colonies lisses (S) sont rondes, brillantes et d'une couleur allant du bleu au bleu-vert. Les colonies rugueuses (R) ont un aspect sec et granuleux et sont opaques, d'une couleur plus terne dans les tons blanc jaunâtre. Les colonies mucosides (M) sont transparentes, de couleur grisâtre et peuvent être identifiées par leur consistance visqueuse lorsqu'on les touche avec une anse. Les colonies intermédiaires (I), qui sont les plus difficiles à classer, ont un aspect intermédiaire entre les formes S et R : elles sont légèrement opaques et plus granuleuses que les colonies S.

Aspect des colonies après coloration au cristal violet : les colonies S ne prennent pas le colorant. Les colonies dissociées (I, M ou R) se colorent de différents tons de rouge ou violet et la surface peut montrer des craquelures radiales. Parfois, un voile coloré en surface glisse à partir de la colonie dissociée et peut être observé sur le côté.

La phase de la colonie peut être confirmée par l'épreuve d'agglutination à l'acriflavine (2). Les colonies S restent en suspension alors que les colonies R sont agglutinées immédiatement et que les colonies mucosides forment des filaments. Les colonies intermédiaires peuvent rester en suspension ou on peut observer une agglutination très légère.

- **Dénombrement des bactéries viables**

5 boîtes au moins de tryptose, sérum-dextrose ou autre milieu gélosé adéquat sont ensemencées chacune avec 0,1 ml de dilutions adéquates du vaccin au moyen d'un râteau stérile en verre, métal ou plastique. Le nombre d'UFC par unité de volume de vaccin est déterminé.

- **Virulence résiduelle (Temps de persistance ou de guérison 50 %) (9, 24, 37, 75)**

- Préparer des suspensions adéquates du lot de semence ou du lot final de *B. abortus* B19 à contrôler (vaccin contrôlé) et de la semence originale de B19 (en tant que souche de référence). Pour cela, récolter une culture de 24 à 48 h de chacune des souches en tampon phosphate (PBS : NaCl 8,5 g ; KH₂PO₄ 1,0 g ; K₂HPO₄ 2,0 g ; eau distillée 1 000 ml ; pH 6,8) et ajuster la suspension en PBS à 10⁹ UFC/ml à l'aide d'un spectrophotomètre (DO de 0,170 à 600 nm). Le nombre exact d'UFC/ml est contrôlé ensuite par ensemencement de dilutions sériées de raison 10 sur un milieu de culture adéquat (blood agar base ou TSA sont recommandés).
- Chacune des 32 souris femelles CD1, âgées de 5 à 6 semaines est inoculée par voie sous-cutanée avec 0,1 ml de la suspension de vaccin contrôlé (soit 10⁸ UFC/souris). La même opération est effectuée en parallèle avec la souche B19 de référence sur un autre groupe de 32 souris. La semence originale de la souche B19, dont l'immunogénicité et/ou la virulence résiduelle ont été validées, peut être obtenue auprès de l'USDA (voir note de bas de page 2 pour l'adresse).
- Les souris sont sacrifiées, par élévation cervicale, par lot de 8 randomisé, 3, 6, 9 et 12 semaines plus tard.
- Les rates sont prélevées et homogénéisées individuellement et stérilement en broyeur de verre (ou dans des sacs stériles adéquats au stomacher) dans 1 ml de PBS stérile.
- Chaque suspension splénique est ensemencée en totalité sur plusieurs boîtes contenant un milieu de culture adéquat. Les boîtes sont incubées dans les conditions standard pendant 5 à 7 jours (limite inférieure de détection : 1 bactérie par rate). Un animal est considéré comme infecté lorsqu'au moins 1 UFC est isolée de la rate.
- Calculer le temps de persistance ou de guérison 50 % (TP₅₀) par la méthode statistique sur SAS[®] développée spécifiquement pour le calcul du TP₅₀ (pour obtenir le programme spécifique SAS[®] voir la note de bas de page 5 pour l'adresse). Pour cela, déterminer le nombre de souris guéries (aucune colonie isolée dans la rate) à chaque point de sacrifice (8 souris par point) et calculer le pourcentage cumulé de souris guéries en fonction du temps, par la méthode de Reed et Muench (décrite dans la réf. 7). La fonction de distribution de ce pourcentage suit une courbe sigmoïde, qui doit être linéarisée pour le calcul du TP₅₀, au moyen de la procédure informatisée PROBIT du SAS[®] « *statistical package* ».
- Comparer statistiquement le parallélisme (interception et pente) entre les courbes de distribution obtenues respectivement pour le vaccin à contrôler et la souche de référence B19 au moyen du

programme SAS® spécifique. Deux valeurs de TP₅₀ ne peuvent être statistiquement comparées que si elles proviennent de deux courbes de distribution parallèles. S'il n'y a pas parallélisme, la virulence résiduelle de la souche contrôlée doit être considérée comme inadéquate et la souche rejetée de la production vaccinale.

- viii) Si le parallélisme est confirmé, comparer statistiquement les valeurs de TP₅₀ obtenues pour la souche contrôlée et la souche de référence au moyen du programme SAS® spécifique. Pour être accepté pour une production de vaccin, le TP₅₀ obtenu pour la souche contrôlée ne doit pas différer significativement de celui de la souche de référence (le TP₅₀ se situe généralement à 7,0 ± 1,3 semaines).

Les principes de la procédure statistique du calcul de la virulence résiduelle donnée ci-dessus ont récemment été décrits en détail (7-9). Les calculs statistiques décrits aux étapes 6) à 8) peuvent être évités cependant grâce à un programme spécifique d'accès facile HTML-JAVA script (Rev2) récemment développé et disponible gratuitement à l'adresse Internet : <http://www.afssa.fr/interne/Rev2.html>.

Si un contrôle a donné de bons résultats sur un lot de semence ou sur un lot de produit fini représentatif, il n'a pas à être répété en routine sur d'autres lots de vaccin préparés selon le même processus de fabrication à partir du même lot de semence.

- **Immunogénicité en modèle souris (7, 8)**

Ce contrôle utilise 3 groupes de 6 souris CD1 femelles, âgées de 5 à 7 semaines et randomisés.

- i) Préparer et ajuster au spectrophotomètre les suspensions de vaccins comme décrit ci-dessus.
- ii) Inoculer par voie sous-cutanée, à chacune des 6 souris du premier groupe, une suspension contenant 10⁵ UFC (sous un volume de 0,1 ml/souris) du vaccin à contrôler.
- iii) Inoculer par voie sous-cutanée, à chacune des 6 souris du second groupe, une suspension contenant 10⁵ UFC (sous un volume de 0,1 ml/souris) du vaccin de référence. Le troisième groupe sert de groupe témoin et doit être inoculé de façon analogue mais avec 0,1 ml de PBS.
- iv) Le nombre exact d'UFC injectées est contrôlé par la suite par l'ensemencement de dilutions sériées de raison 10 sur un milieu de culture adéquat (*blood agar base* ou TSA sont recommandés).
- v) Toutes les souris sont soumises à une épreuve virulente 30 jours après vaccination (et immédiatement après 16 h de jeûne), par inoculation intrapéritonéale d'une suspension (0,1 ml/souris) contenant 2 × 10⁵ UFC de *B. abortus* souche 544 (CO₂-dépendante), préparée, ajustée et dénombrée en suite comme décrit plus haut.
- vi) Sacrifier les souris par élongation cervicale 15 jours plus tard.
- vii) Chaque rate est prélevée stérilement, dégraissée, pesée individuellement puis homogénéisée. Les rates peuvent également être congelées et conservées à -20 °C de 24 h à 7 semaines.
- viii) Les rates sont prélevées et chaque rate est homogénéisée stérilement en broyeur de verre (ou dans des sacs stériles adéquats au stomacher) dans 9 fois son poids de PBS, pH 6,8 et 3 dilutions sériées de raison 10 (1/10, 1/100 et 1/1 000) de chaque broyat sont effectuées dans le même diluant. Quatre fractions de 0,2 ml de chaque dilution sont ensemencées chacune par étalement sur une boîte de gélose. Deux boîtes sont incubées en atmosphère enrichie à 10 % en CO₂ (qui permet la croissance à la fois de la souche vaccinale et de la souche d'épreuve 544) et les deux autres boîtes en atmosphère normale (qui inhibe la croissance de la souche d'épreuve 544 CO₂-dépendante), toutes à 37 °C pendant 5 jours.
- ix) Les colonies de *Brucella* doivent être dénombrées sur les dilutions correspondant aux boîtes présentant moins de 300 UFC. Lorsque aucune colonie n'est visible sur les boîtes correspondant à la dilution du 1/10, la rate d'origine est considérée contenir 5 bactéries. Les nombres de *Brucella* par rate (X) sont enregistrés et transformés en Y après le calcul suivant : $Y = \log (X/\log X)$. La moyenne et l'écart type des Y correspondant à chaque groupe de souris sont ensuite calculés.
- x) Les conditions du contrôle sont satisfaisantes si 1) la réponse des souris non vaccinées (moyenne des Y) est d'au moins 4,5 ; 2) la réponse des souris vaccinées au moyen de la souche de référence vaccinale B19 est inférieure à 2,5 ; et 3) l'écart type calculé sur chaque lot de souris est inférieur à 0,8.
- xi) Opérer les comparaisons statistiques (Le test « *least significant differences* [LSD] » est recommandé) des valeurs d'immunogénicité obtenues chez les souris vaccinées avec le vaccin à contrôler et celles obtenues avec la souche B19 de référence et celles du groupe témoin non vacciné. Le vaccin contrôlé est satisfaisant si la valeur d'immunogénicité obtenue chez les souris vaccinées avec ce vaccin est significativement plus faible que celle obtenue dans le groupe témoin non vacciné et, de plus, ne diffère pas significativement de celle obtenue dans le groupe vacciné avec le vaccin de référence (Pour une information détaillée sur cette procédure, voir note de bas de page 5 pour l'adresse d'un contact).

Si un contrôle a donné de bons résultats sur un lot de produit fini représentatif, il n'a pas à être répété en routine sur d'autres lots de vaccin préparés selon le même processus de fabrication à partir du même lot de semence.

- **Vaccin RB51**

La démonstration d'une corrélation entre le nombre de bactéries (UFC) de la semence primaire et la protection induite a été introduite pour l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché du vaccin RB51 à usage bovin aux États-Unis. Des tests d'activité *in vivo* ne sont pas effectués en routine pour les productions en série du vaccin RB51. Aux États-Unis d'Amérique, le dénombrement des bactéries viables a été accepté et est utilisé pour mesurer l'activité (cette approche est identique à celle utilisée pour le vaccin B19 aux États-Unis d'Amérique). Un test chez des souris femelles Balb/c utilisant 1×10^4 UFC de la souche 2308 de *B. abortus* comme épreuve virulente a été proposé, mais la corrélation entre ce test et la protection chez les bovins n'est pas définitivement établie. Aux États-Unis d'Amérique, le test officiel se limite à un dénombrement de germes viables (85). Les vaccins en phase rugueuse pour la brucellose ont été revus en détail par ailleurs (55).

d) Durée de l'immunité

La vaccination des veaux par une dose complète de vaccin B19 est considérée comme inductrice d'une immunité de longue durée et un rappel n'est pas recommandé. Cependant, dans le doute, il peut être sensé de revacciner les bovins en zone de forte enzootie.

e) Stabilité

Les caractéristiques du vaccin *Brucella abortus* B19 sont stables s'il est préparé à partir d'un stock de semence d'origine appropriée et si les résultats des contrôles en cours de fabrication et des contrôles de produit fini sont conformes. Dans ces conditions, il ne montre aucune tendance à la réversion. Le vaccin lyophilisé connaît une perte progressive de viabilité, mais il doit conserver son activité pour la durée de validité du produit. Ceci peut être obtenu par un dénombrement initial (immédiatement après lyophilisation) en excès significatif par rapport au dénombrement minimal requis. Le maintien de la chaîne du froid durant la distribution du vaccin garantit ensuite sa viabilité.

La souche RB51 de *Brucella abortus* n'a jamais montré de tendance à la réversion vers une forme lisse virulente après plusieurs passages *in vitro* ou *in vivo*. Ceci est probablement dû à la nature et à la localisation des mutations mises en évidence dans cette souche. Le gène *wboA* de la souche RB51 de *Brucella abortus* est interrompu par un élément IS711 qui empêche la synthèse de l'OPS. Des données non publiées indiquent qu'il existe également une seconde mutation affectant l'exportation de l'OPS à la surface de la bactérie ou l'ancrage de l'OPS sur le noyau (core) du LPS, ou les deux.

f) Agents de conservation

Aucun agent de conservation antimicrobien ne doit être utilisé dans les vaccins vivants B19 ou RB51. Pour la préparation du vaccin lyophilisé, on recommande l'utilisation d'un stabilisateur contenant 2,5 % d'hydrolysate de caséine, par exemple Tryptone (Oxoid), 5 % de sucrose et 1 % de glutamate de sodium, dissous en eau distillée et stérilisé par filtration.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Les souches vaccinales *Brucella abortus* B19 et RB51, bien qu'atténuées, ont conservé leur pouvoir pathogène pour l'homme. Les cultures et les suspensions bactériennes doivent être manipulées dans des conditions appropriées de biosécurité. La reconstitution du vaccin et la manipulation du vaccin reconstitué doivent être effectuées avec précautions de manière à éviter les inoculations accidentelles ou les contaminations oculaires et cutanées. Les restes de vaccin et de matériel d'injection doivent être décontaminés au moyen d'un désinfectant adéquat (dérivé phénolé, iodophore ou aldéhyde) aux concentrations recommandées. Un avis médical est requis dans le cas d'une exposition accidentelle. L'efficacité du traitement antibiotique des infections liées à B19 ou RB51 n'a pas été formellement établie. Cependant, les CDC pourront fournir des recommandations en matière de traitement. Lors de contamination par le B19, un traitement associant la doxycycline et la rifampicine peut être recommandé. Dans le cas du RB51 (souche résistante à la rifampicine) le traitement à la rifampicine doit être évité et une association de doxycycline et de streptomycine ou de gentamycine devrait être administrée sauf chez les femmes enceintes qui devraient être traitées avec du triméthoprim sulfa-methoxazole. Les études sur le traitement des personnes exposées à la souche RB51 sont limitées (5), jusqu'à présent un seul cas d'infection humaine a été rapporté par la souche RB51. La souche RB51 est très sensible aux tétracyclines et un traitement avec seulement de la doxycycline peut donner des résultats satisfaisants (5).

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir Section C2.4.b.

b) Activité

Pour le vaccin lyophilisé, l'activité doit être déterminée sur le produit fini. Le protocole est décrit en Section C2.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ADONE R. & CIUGHINI F. (1999). Complement fixation test to assess humoral immunity in cattle and sheep vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **56**, 787–790.
2. ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D. & VERGER J.M. (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
3. ANGUS R.D. & BARTON C.E. (1984). The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. *Dev. Biol. Stand.*, **56**, 349–356.
4. ASARTA A. (1989). Erradicación de la brucelosis en el ganado vacuno de Navarra. In: Actas del XII Congreso Nacional de Microbiología. Sociedad Española de Microbiología (Ed.), SEM, Pamplona, 371–371.
5. ASHFORD D.A., DI PIETRA J., LINGAPPA J., WOODS C., NOLL H., NEVILLE B., WEYANT R., BRAGG S.L., SPIEGEL R.A., TAPPERRRO J. & PERKINS B.A. (2004). Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, **22**, 3435–3439.
6. BARTON C.E. & LOMME J.R. (1980). Reduced-dose whole herd vaccination against brucellosis: A review of recent experience. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **177**, 1218–1220.
7. BONET-MAURY P., JUDE A. & SERVANT P. (1954). La mesure statistique de la virulence et l'immunité. Application à l'étude de la virulence du bacille typhique et à la mesure du pouvoir immunisant des vaccins antityphoidiques. *Rev. d'Immun. Th. Antimic.*, **18**, 21–49.
8. BOSSERAY N. (1992). Le vaccin Rev.1: dérive des caractères d'immunogénicité et de virulence indépendante des marqueurs classiques. In: Prevention of Brucellosis in the Mediterranean Countries, Plommet M., ed. Pudoc Scientific, Wageningen, The Netherlands, 182–186.
9. BOSSERAY N. (1993). Control methods and thresholds of acceptability for anti-*Brucella* vaccines. *Dev. Biol. Stand.*, **79**, 121–128.
10. BRACEWELL C.D. & CORBEL M.J. (1980). An association between arthritis and persistent serological reactions to *B. abortus* in cattle from apparently brucellosis-free herds. *Vet. Rec.*, **106**, 99.
11. BRICKER B.J. (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.*, **90**, 435–446.
12. BRICKER B.J. EWALT D.R. (2005). Evaluation of HOOOF-Print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: results with four performance criteria. *BMC Microbiol.*, 23June, **5**, 37.
13. BRICKER B.J., EWALT D.R. & HALLING S.M. (2003). *Brucella* 'HOOOF-Prints' strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol.*, 11 June, **3**, 15.
14. BRICKER B.J., EWALT D.R., OLSEN S.C. & JENSEN A.E. (2003). Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 374–378.
15. BRICKER B.J. & HALLING S.M. (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2660–2666.

16. BRICKER B.J. & HALLING S.M. (1995). Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains B19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 1640–1642.
17. CLOECKAERT A., GRAYON M. & GREPINET O. (2002). Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the rpsL gene, *Vaccine*, **7**, 19–20.
18. CLOECKAERT A., VERGER J.M., GRAYON M., PAQUET J.Y., GARIN-BASTUJI B., FOSTER G. & GODFROID J. (2001). Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect.*, **3**, 29–38.
19. CLOECKAERT A., ZYGMUNT M. & GUILLOTEAU L. (2002). *Brucella abortus* vaccine strain RB51 produces low levels of M-like O-antigen. *Vaccine*, **20**, 1820–1822.
20. CORBEL M.J., BRACEWELL C.D., THOMAS E.L. & GILL K.P.W. (1979). Techniques in the identification of *Brucella* species. In: Identification Methods for Microbiologists, Second Edition. Skinner F.A. & Lovelock D.W., eds. Academic Press, London, UK and New York, USA, 86–89.
21. CORBEL M.J. & HENDRY D.M.F.D. (1983). Methods for the identification of *Brucella*. Booklet 2085. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Lion House, Alnwick, Northumberland, UK.
22. CORBEL M.J., STUART F.A., BREWER R.A., JEFFREY M. & BRADLEY R. (1989). Arthropathy associated with *Brucella abortus* Strain 19 vaccination in cattle. 1. Examination of field cases. *Br. Vet. J.*, **145**, 337.
23. DE MASSIS F., GIOVANNINI A., DI EMIDIO B., RONCHI G.F., TITTARELLI M., DI VENTURA M., NANNINI D. & CAPORALE V. (2005). Use of the complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *Vet. Ital.*, **41** (4), 291–299.
24. DIAZ R., GARATEA P., JONES L.M. & MORIYON I. (1979). Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 37–41.
25. EUROPEAN COMMISSION (1999). The modification of Technical Annexes of Council Directive 64/432/EEC to take account of Scientific Developments regarding Tuberculosis, Brucellosis and Enzootic Bovine Leucosis. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare adopted 11 October 1999. Sanco/B3/R10/1999.
26. EWALT D.R. & BRICKER B.J. (2000). Validation of the abbreviated AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 3085–3086.
27. EWALT D.R. & BRICKER B.J. (2003). Identification and differentiation of *Brucella abortus* field and vaccine strains by BaSS-PCR. In: Methods in Molecular Biology, Volume 216: PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols, Saches K. & Frey J., eds. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 97–108.
28. EWALT D.R., PAYEUR J.B., MARTIN B.M. CUMMINS D.R. MILLER W.G. (1994). Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 448–452.
29. EWALT D.R., PAYEUR J.B., RHYAN J.C. & GEER P.L. (1997). *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 417–420.
30. FARRELL I.D. (1974). The development of new selective medium for the Isolation of *Brucella abortus* from Contaminated Sources. *Res. Vet. Sci.*, **16**, 280–286.
31. FOSTER G., MACMILLAN A.P., GODFROID J., HOWIE F., ROSS H.M., CLOECKAERT A., REID R.J., BREW S. & PATTERSON I.A.P. (2002). A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet. Microbiol.*, **90**, 563–580.
32. GALANOS C., LUDERITZ O., WETSPHAL O. (1969). A new method for the extraction of R lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, **9**, 245–249.
33. GALL D., NIELSEN K., FORBES L., COOK W., LECLAIR D., BALSEVICIUS S., KELLY L., SMITH P. & MALLORY M. (2001). Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. *J. Wildl. Dis.*, **37**, 110–118.

34. GALL D., NIELSEN K., FORBES L., DAVIS D., ELZER P., OLSEN S., BALSEVICIUS S., KELLY L., SMITH P., TAN S. & JOLY D. (2000). Validation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological tests for detection of serum antibody to *Brucella abortus* in bison. *J. Wildl. Dis.*, **36**, 469–476.
35. GARIN B., TRAP D. & GAUMONT R. (1985). Assessment of the EDTA seroagglutination test for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Rec.*, **117**, 444–445.
36. GODFROID J., SAEGERMAN C., WELLEMANS V., WALRAVENS K., LETESSON J.J., TIBOR A., McMILLAN A., SPENCER S., SANAA M., BAKKER D., POUILLOT R. & GARIN-BASTUJI B. (2002). How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Vet. Microbiol.*, **90**, 461–477.
37. GRILLO M.J., BOSSERAY N. & BLASCO J.M. (2000). *In vitro* markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial *Brucella melitensis* Rev.1 and *Brucella abortus* B19 vaccines. *Biologicals*, **28**, 119–127.
38. HENDRY D.M.F.D., CORBEL M.J., BELL R.A. & STACK J.A. (1985). *Brucella* antigen production and standardisation. Booklet 2499. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Lion House, Alnwick, Northumberland, UK.
39. 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, 815 pp.
40. JENSEN A.E., CHEVILLE N.F., THOEN C.O., MACMILLAN A.P. & MILLER W.G (1999). Genomic fingerprinting and development of a dendrogram for *Brucella* spp. isolated from seals, porpoises, and dolphins. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 152–157.
41. JIMENEZ de BAGUES M.P., MARIN C. & BLASCO J.M. (1991). Effect of antibiotic therapy and strain 19 vaccination on the spread of *Brucella melitensis* within an infected dairy herd. *Prev. Vet. Med.*, **11**, 17–24.
42. JOINT FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON BRUCELLOSIS (1986). Technical Report Series 740, Sixth Report. WHO, Geneva, Switzerland.
43. JONES L.M., BERMAN D.T., MORENO E., DEYOE B.L., GILSDORF M.J., HUBER J.D. & NICOLETTI P.L. (1980). Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, **12**, 753–760.
44. KITTELBERGER R., REICHEL M., JOYCE M. & STAACK C. (1997). Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9:III. Specificity of the *in vitro* antigen-specific gamma interferon test for bovine brucellosis diagnosis in experimentally *Yersinia enterocolitica* O:9 infected cattle. *Vet. Microbiol.*, **57**, 361–371.
45. LE FLÈCHE P., JACQUES I., GRAYON M., AL DAHOUK S., BOUCHON P., DENOEUDE F., NÖCKLER K., NEUBAUER H., GUILLOTEAU L.A. & VERGNAUD G. (2006). Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.*, **6**, 9.
46. LORD V.R. & CHERWONOGRODZKY J.W. (1992). Evaluation of polysaccharide, lipopolysaccharide, and beta-glucan antigens in gel immunodiffusion tests for brucellosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **53**, 389–391.
47. LORD V.R., ROLO M.R. & CHERWONOGRODZKY J.W. (1989). Evaluation of humoral immunity to *Brucella* sp in cattle by use of an agar-gel immunodiffusion test containing a polysaccharide antigen. *Am. J. Vet. Res.*, **50**, 1813–1816.
48. MACMILLAN A.P. & COCKREM D.S. (1985). Reduction of non-specific reactions to the *Brucella abortus* serum agglutination test by the addition of EDTA. *Res. Vet. Sci.*, **38**, 288–291.
49. MACMILLAN A.P., GREISER-WILKE I., MOENNIG V. & MATHIAS L.A. (1990). A competition enzyme immunoassay for brucellosis diagnosis. *Dtsch Tierarztl. Wochenschr.*, **97**, 83–85.
50. MARIN C.M., ALABART J.L. & BLASCO J.M. (1996). Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 426–428.

51. MICHAUX-CHARACHON S., BOURG G., JUMAS-BILAK E., GUIGUE-TALET P., ALLARDET-SERVENT A., O'CALLAHAN D. & RAMUZ M. (1997). Genome structure and phylogeny in genus *Brucella*. *J. Bacteriol.*, **179**, 3244–3249.
52. MOORE T. & MITCHELL C.A. (1950) Vaccination of sexually mature cows with *Brucella abortus* strain 19 vaccine. *Can. J. Comp. Med.*, **14**, 209–213.
53. MORENO E., CLOECKAERT A. & MORIYON I. (2002). *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.*, **90**, 209–227.
54. MORGAN W.J.B., MACKINNON D.J., LAWSON J.R. & CULLEN G.A. (1969). The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Vet. Rec.*, **85**, 636–641.
55. MORIYON I. (2002). Rough vaccines in animal brucellosis. *In: Proceedings of the CIHEAM Advanced Seminar – Human and Animal Brucellosis, Pamplona, Spain, 16–20 September 2002.*
56. MORIYON I., GRILLO M.J., MONREAL D., GONZALEZ D., MARIN C.M., LOPEZ-GONI I., MAINAR-JAIME R.C., MORENO E. & BLASCO J.M. (2004). Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.*, **35**, 1–38.
57. MUNOZ P., MARIN C., MONREAL D., GONZALES D., GARIN-BASTUJI B., DIAZ R., MAINAR-JAIME R., MORIYON I. & BLASCO J. (2005). Efficacy of several serological tests and antigens for the diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 141–151.
58. NICOLETTI P. (1979). The effects of adult cattle vaccination with strain 19 on the incidence of brucellosis in dairy herds in Florida and Puerto Rico. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, **83**, 75–80.
59. NICOLETTI P. (1992). An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Trop. Anim. Health Prod.*, **24**, 40–44.
60. NIELSEN K. (1990). The serological response of cattle immunized with *Yersinia enterocolitica* O:9 or O:16 to *Yersinia* and *Brucella abortus* antigens in enzyme immunoassays. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **24**, 373–382.
61. NIELSEN K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.*, **90**, 447–459.
62. NIELSEN K., GALL D., JOLLEY M., LEISHMAN G., BALSEVICIUS S., SMITH P., NICOLETTI P. & THOMAS F. (1996). A homogenous fluorescence polarisation assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J. Immunol. Methods*, **195**, 161–168.
63. NIELSEN K., KELLY L., GALL D., BALSEVICIUS S., BOSSE J., NICOLETTI P. & KELLY W. (1996). Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Prev. Vet. Med.*, **26**, 17–32.
64. 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.
65. NIELSEN K., SAMAGH B.S., SPECKMANN G. & STEMSHORN B. (1979). The bovine immune response to *Brucella abortus*. II. Elimination of some sporadic serological reactions by chelation of divalent cations. *Can. J. Comp. Med.*, **43**, 420–425.
66. NIELSEN K., SMITH P., YU W., NICOLETTI P., ELZER P., ROBLES C., BERMUDEZ R., RENTERIA T., MORENO F., RUIZ A., MASSENGILL C., MUENKS Q., JURGERSEN G., TOLLERSRUD T., SAMARTINO L., CONDE S., FORBES L., PEREZ B., ROJAS X. & MINOS A. (2005). Towards a single screening test for brucellosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 1027–1038.
67. NIELSEN K., SMITH P., YU W., NICOLETTI P., ELZER P., VIGLIOCCO A., SILVA P., BERMUDEZ R., RENTERIA T., MORENO F., RUIZ A., MASSENGILL C., MUENKS Q., KENNY K., TOLLERSRUD T., SAMARTINO L., CONDE S., DRAGHI DE BENITEZ G., GALL D., PEREZ B. & ROJAS X. (2004). Enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis: chimeric protein A-protein G as a common enzyme labelled detection reagent for sera of different animal species *Vet. Microbiol.*, **101**, 123–129.
68. NIELSEN K., SMITH P., YU W., NICOLETTI P., JURGERSEN G., STACK J. & GODFROID J. (2006). Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella* sp. and *Yersinia enterocolitica* O:9 in cattle and pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **109**, 69–78.

69. OCAMPO-SOSA A.A., AGÜERO-BALBÍN J. & GARCÍA-LOBO J.M. (2005). Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet. Microbiol.*, **110**, 41–51.
70. OLSEN S.C. (2000). Immune responses and efficacy after administration of commercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to cattle. *Vet. Therapeutics*, **3**, 183–191.
71. OLSEN S.C. (2002). Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* Strain RB51. *Res. Vet. Sci.*, **59**, 135–140.
72. PALMER M, CHEVILLE N & JENSEN A (1996). Experimental infection of pregnant cattle with vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: Pathologic, bacteriologic and serologic findings. *Vet. Pathol.*, **33**, 682–691.
73. PALMER M.V., OLSEN S.C. & CHEVILLE N.F. (1997). Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 472–477.
74. POUILLOT R., GARIN-BASTUJI B., GERBIER G., COCHE Y., CAU C., DUFOUR B. & MOUTOU F. (1997). The brucellin skin test as a tool to differentiate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Vet. Res.*, **28**, 365–374.
75. POUILLOT R., GRILLO M.J., ALABART J.L., GARIN-BASTUJI B. & BLASCO J.M. (2004). Statistical procedures for calculating the residual virulence of *Brucella abortus* strain 19 (B19) and *Brucella melitensis* strain Rev.1 vaccines in mice: theoretical basis and practical applications. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **22** (3), 1051–1063.
76. RIBER U. & JURGERSEN G. (2004). Cellular immune responses can differentiate *Brucella suis* and *Yersinia enterocolitica* O:9 infection in pigs. Poster WK11.5.1, International Veterinary Immunology Symposium, Quebec City, Canada, 360 pp.
77. ROOP II, R.M., PRESTON-MOORE D., BAGCHI T. & SCHURIG G.G. (1987). Rapid Identification of smooth *Brucella* species with a monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 2090–2093.
78. SAERGERMAN C., VO T.-K.O., DE WAELE L., GILSON D., BASTIN A., DUBRAY G., FLANAGAN P., LIMET J.N., LETESSON J.J. & GODFROID J. (1999). Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. *Vet. Rec.*, **145**, 214–218.
79. SAMARTINO L.E, FORT M., GREGORET R. & SCHURIG G.G. (2000) Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. *Prev. Vet. Med.*, **45**, 193–199.
80. SANGARI F.J., GARCIA-LOBO J.M. & AGUERO J. (1994). The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **121**, 337–342.
81. SCHURIG G.G., ROOP R.M., BUHRMAN D., BOYLE S., BAGCHI T. & SRIRANGANATHAN N. (1991). Biological Properties of RB51, a stable, O-chain deficient mutant of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, **28**, 171–188.
82. SCHURIG G.G., SRIRANGANATHAN N. & CORBEL M.J. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future, *Veterinary microbiology*, **90**, 479–496.
83. STACK J.A., PERRETT L.L., BREW S.D., MACMILLAN A.P. (1999). C-ELISA for bovine brucellosis suitable for testing poor quality samples. *Vet. Record*, **145**, 735–736.
84. STEVENS M.G., HENNAGER S.G., OLSEN S.C. & CHEVILLE N.F. (1994). Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1065–1066.
85. STEVENS M.G., OLSEN S.C., PUGH G.W. & BREES D. (1995). Comparison of immune responses and resistance to brucellosis in mice vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *Infect. Immun.*, **63**, 264–270.
86. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICES (APHIS) (2003). Availability of an Environmental Assessment for Licensing of *Brucella abortus* Vaccine, Strain RB-51, Live Culture. *Federal Register*, 18 Feb 2003, **68** (32), 7761.
87. UZAL F., SAMARTINO L., SCHURIG G., CARRASCO A., NIELSEN K., CABRERA R. & TADDEO H. (2000). Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle. *Vet. Res. Comm.*, **24**, 143–151.

88. VAN DRIMMELEN G. & HORWELL F. (1964). Preliminary findings with the use of *Brucella melitensis* strain Rev 1 as a vaccine against brucellosis in cattle. *OIE Bull.*, **62**, 987.
89. VEMULAPALLI R., MCQUISTON J.R., SCHURIG G.G., SRIRANGANATHAN N., HALLING S.M. & BOYLE S.M. (1999). Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 760–764.
90. VERGER J.M. (1985). *B. melitensis* infection in cattle. In: *Brucella melitensis*, Plommet & Verger, eds. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht-Boston-Lancaster. 197–203.
91. VILLARROEL M., GRELL M. & SAENZ. R. (2000). Reporte de primer caso humano de aislamiento y tipificación de *Brucella abortus* RB51. *Arch. Med. Vet.*, **32**, 89–91.
92. WEYNANTS V., GILSON D., CLOECKAERT A., TIBOR A., DENOEL P.A., GODFROID F., LIMET J.N. & LETESSON J.J. (1997). Characterization of smooth-lipopolysaccharide and O polysaccharides of *Brucella* species by competition binding assays with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, **65**, 1939–1943.
93. WEYNANTS V., GODFROID J., LIMBOURG B., SAEGERMAN C. & LETESSON J. (1995). Specific bovine brucellosis diagnosis based on in vitro specific gamma interferon production. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 706–712.
94. WEYNANTS V., WALRAVENS K., DIDENBURGH C., FLANAGAN P., GODFROID J. & LETESSON J. (1998). Quantitative assessment by flow cytometry of T-lymphocytes producing antigen-specific gamma interferon in *Brucella* immune cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **66**, 309–320.
95. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2005). WHO Laboratory Biosafety Manual, Second Edition. WHO, Geneva, Switzerland.
96. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2005). Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances., WHO, Geneva, Switzerland,
http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2005_22r%20.pdf
97. WRIGHT P.F., NILSSON E., VAN ROOIJ E.M.A., LELENTA M. & JEGGO M.H. (1993). Standardisation 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.
98. WRIGHT P.F., TOUNKARA K., LELENTA M. & JEGGO M.H. (1997). International reference Standards: antibody standards for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Rev. Sci. Tech.*, **3**, 824–832.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la brucellose 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).

CHAPITRE 2.4.4.

CYSTICERCOSE BOVINE

Se reporter au chapitre 2.9.5. Cysticercoses.

*
* *

CAMPYLOBACTÉRIOSE GÉNITALE BOVINE

RÉSUMÉ

Définition de la maladie : la campylobactériose génitale bovine (CGB) est une maladie vénérienne aussi connue sous le nom de campylobactériose vénérienne bovine (CVB). L'agent causal de cette maladie sexuellement transmissible est *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, qui est divisé en deux sous-espèces étroitement apparentées : *C. fetus* subsp. *venerealis* et *C. fetus* subsp. *fetus*. Par définition, *C. fetus* subsp. *venerealis* est associé à la CGB caractérisée par des problèmes de fertilité et des pertes économiques considérables, notamment dans les régions d'enzootie. Les infections bovines à *C. fetus* subsp. *fetus* sont associées à des avortements et surviennent de façon sporadique.

Description de la maladie : la CGB est une maladie vénérienne caractérisée par de l'infertilité, une mortalité embryonnaire précoce et de l'avortement. Elle est causée par *C. fetus* subsp. *venerealis*, une bactérie qui possède un tropisme prononcé pour l'appareil génital des bovins. La transmission de l'agent infectieux s'opère principalement lors de la monte naturelle, mais la présence de *C. fetus* subsp. *venerealis* dans la semence de taureaux porteurs chroniques crée un risque de transmission de la maladie lors d'insémination artificielle.

Identification de l'agent pathogène : des échantillons provenant de taureaux, de vaches ou de fœtus peuvent être testés pour la présence de l'agent causal. Il s'agit d'une bactérie Gram négative, qui se présente sous forme de bâtonnets fins incurvés en forme de S, de « mouette » ou en spirale, et qui peut être cultivée en condition microaérobie à 37 °C pendant au moins 3 jours. La confirmation de l'isolement et le diagnostic différentiel avec *C. fetus* se fait à l'aide de méthodes biochimique ou moléculaire. L'immunofluorescence peut aussi être utilisée pour l'identification bactérienne, mais cette technique ne permet pas de différencier les sous-espèces.

Épreuves sérologiques : une épreuve immuno-enzymatique (ELISA) peut être utilisée pour vérifier l'immunité au niveau du troupeau, mais ne convient pas pour le diagnostic de l'infection au niveau individuel. Cette épreuve ne peut pas faire la différence, lors d'une infection, entre les deux sous-espèces.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : un vaccin peut être préparé à partir de cultures de *C. fetus* subsp. *venerealis* et/ou de *C. fetus* subsp. *fetus*, qui présente des antigènes communs avec *C. fetus* subsp. *venerealis*. Ce vaccin est inactivé par le formol et peut être administré, mélangé à un adjuvant huileux.

A. INTRODUCTION

1. La maladie

La campylobactériose génitale bovine (CGB), aussi connue sous le nom de campylobactériose vénérienne bovine (CVB), est une maladie vénérienne qui se caractérise chez le bétail par de l'infertilité, une mortalité embryonnaire précoce et de l'avortement. L'agent causal de cette maladie sexuellement transmissible est *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Il peut être isolé du tractus génital des bovins (par ex. le smegma préputial ou le mucus vaginal) ou des organes internes des avortons.

Campylobacter fetus comprend deux sous-espèces étroitement apparentées : *C. fetus* subsp. *venerealis* et *C. fetus* subsp. *fetus* (28). Un biovar intermédiaire de *C. fetus* subsp. *venerealis* a été décrit, mais il n'est pas encore clairement établi si ce biovar a des caractéristiques cliniques spécifiques. Par définition, *C. fetus* subsp. *venerealis* est associé à la CGB caractérisée par des problèmes de fertilité et des pertes économiques

considérables, notamment dans les régions d'enzootie. Les infections à *C. fetus* subsp. *fetus* peut être retrouvé de l'intestin des bovins et d'autres espèces animales (6). *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* peut être isolé d'avortons bovins ce qui démontre un rapport avec la clinique chez le bétail. Cependant, *C. fetus* subsp. *fetus* est associé à des cas sporadiques d'avortement tandis que *C. fetus* subsp. *venerealis* est associé à des avortements de type enzootique et des problèmes d'infertilité dans certaines régions.

Bien que *C. fetus* soit considéré comme un agent pathogène primaire en médecine vétérinaire, *C. fetus* subsp. *fetus* est reconnu à l'occasion comme un agent pathogène émergent opportuniste en médecine humaine. En général, les infections surviennent chez des personnes immunodéprimées ou au cours de la gestation et revêtent une forme systémique avec une grande variété de complications neurologiques ou vasculaires (21).

2. Taxonomie

En 1991, une révision de la taxonomie et de la nomenclature du genre *Campylobacter* a été proposée. Selon le *Manuel de Bergey*, le genre *Campylobacter* comprend 16 espèces et 6 sous-espèces. Récemment, deux espèces supplémentaires ont été proposées. Deux sous-espèces de *C. fetus* ont été identifiées. Bien que les symptômes des deux sous-espèces soient proches, elles ont été à l'origine reconnues sur la base des différences cliniques (19, 28). Les deux sous-espèces peuvent être différenciées au laboratoire par une caractéristique biochimique : la tolérance à la glycine. La sous-espèce *venerealis* est considérée comme sensible à la glycine tandis que la sous-espèce *fetus* est tolérante. Des souches du biovar *intermedius* de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* ont été décrites (18), mais leur position taxonomique doit encore être précisée. Les analyses des profils des protéines des bactéries par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) n'ont montré aucune différence entre les deux sous-espèces de *C. fetus* (27). Des études comparatives d'hybridation ADN-ADN n'ont pas permis de montrer de différences majeures entre les sous-espèces *venerealis* et *fetus* (10). Cependant, plusieurs techniques moléculaires se sont révélées capables de différencier les deux sous-espèces, notamment l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) (12, 22, 25, 30), l'électrophorèse d'ADN sur champs pulsés (PFGE pour *pulsed-field gel electrophoresis*) (17), le typage des séquences multilocus (MLST pour *multilocus sequence typing*) (23), et l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments amplifiés (AFLP pour *amplified fragment length polymorphism*) (29) (voir aussi la Section B.1.h).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Isolement et identification de l'agent pathogène (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

a) Prélèvement des échantillons

i) Chez le mâle : sécrétions ou mucus du prépuce et semence

Chez le taureau, le smegma peut être récolté par différentes méthodes : grattage (20), par aspiration (3) ou par lavage du prépuce (4). Le smegma du prépuce est en général collecté par grattage et peut alors être utilisé pour l'isolement de la bactérie, ou il peut être rincé dans un tube avec environ 5 ml de tampon phosphate (PBS) contenant 1 % de formol pour servir au test d'immunofluorescence (IF). Le smegma peut aussi être récolté sur un vagin artificiel après récupération de la semence, par lavage du vagin artificiel avec 20 à 30 ml de (PBS).

Pour le lavage du prépuce, 20 à 30 ml de PBS sont introduits dans le sac préputial. Après un massage vigoureux de 15 à 20 s, le liquide est récupéré dans un flacon

La semence doit être récupérée dans les conditions les plus aseptiques possibles. Les échantillons de smegma doivent être dilués dans du PBS et sont directement ensemencés sur milieu de culture ou sur milieu de transport et d'enrichissement.

ii) Chez la femelle : mucus vaginal et cervico-vaginal

Les prélèvements sont effectués soit par aspiration soit par lavage de la cavité vaginale.

Avant aspiration, la région vulvaire est nettoyée avec un tissu de papier, et une pipette pour insémination artificielle (IA) ou une pipette de Cassou (étui bleu) est insérée dans la cavité vaginale de façon à ce que la partie antérieure atteigne le col de l'utérus (3). Une aspiration légère est réalisée en la déplaçant doucement en avant et en arrière. La pipette est ensuite retirée et le mucus collecté est ensemencé directement sur milieu de culture ou milieu de transport, et un milieu d'enrichissement.

Le mucus cervico-vaginal peut aussi être récupéré par lavage de la cavité vaginale : 20 à 30 ml de PBS sont injectés à l'aide d'un cathéter stérile monté sur seringue d'IA. Le liquide est aspiré et réinjecté

dans la cavité 4 à 5 fois, avant d'être collecté et étalé directement sur un milieu de culture ou ensemencé dans un milieu de transport et un milieu d'enrichissement. Le liquide de lavage de la cavité vaginale peut aussi être récupéré en utilisant un tampon ou une gaze que l'on place dans le vagin pendant 5 à 10 min après avoir injecté du PBS. Les échantillons de mucus vaginal obtenus par aspiration peuvent être dilués dans du PBS ou directement ensemencés sur milieu de culture ou sur milieu de transport et d'enrichissement.

Le mucus vaginal est transféré dans environ 5 ml de PBS contenant 1 % de formol.

iii) *Avortons, placentas*

Le placenta, ainsi que le contenu stomacal, les poumons et le foie du fœtus fournissent les meilleurs prélèvements pour l'isolement de l'agent causal. Les prélèvements sont inoculés directement sur des milieux d'enrichissement et de transport, ou dans du PBS à 1 % de formol pour l'épreuve de l'IF.

b) Transport des échantillons

L'utilisation d'un milieu de transport est indispensable si les prélèvements ne sont pas testés au laboratoire le jour même de la collecte. Pour l'envoi au laboratoire, si l'échantillon n'est pas inoculé dans un milieu de transport, il doit être dans un container réfrigéré (entre 4 et 10 °C) et protégé de la lumière.

Plusieurs milieux de transport et d'enrichissement sont disponibles, tels que les milieux de Clark, de Lander, SBL, de Foley et Clark, de Weybridge et le milieu de Cary blair (7, 11, 15).

Certains des milieux d'enrichissement et de transport précités contiennent de la cycloheximide. En raison du risque potentiel de toxicité de ce produit, l'amphotéricine B peut être une solution alternative.

c) Traitement des échantillons

À leur arrivée au laboratoire les échantillons sont directement ensemencés en milieu de culture ou travaillés plus tard si nécessaire

i) *Prélèvements du tractus génital*

Le liquide de lavage préputial est centrifugé (3 500 *g*) pour concentrer le prélèvement. L'échantillon final (réduit à 250 µl) est ensemencé sur un milieu de culture (directement et/ou après filtration).

Si le mucus vaginal n'est pas trop visqueux, il peut être ensemencé directement ou dilué dans un volume égal de PBS. Si le mucus vaginal est très visqueux, il peut toutefois être nécessaire de le liquéfier en ajoutant un volume égal de solution de cystéine (solution aqueuse de cystéine sous forme d'hydrochlorure, concentrée à 0,25 g/100 ml, à pH 7,2 et stérilisée par filtration). Après 15 à 20 min, le mucus dilué et liquéfié est ensemencé en milieu de culture.

ii) *Avortons et placentas*

Le contenu stomacal des fœtus est directement ensemencé en milieu de culture approprié. Les prélèvements d'organes sont désinfectés en surface à la flamme puis homogénéisés. L'homogénat est ensuite ensemencé en milieu de culture.

Après avoir lavé les membranes placentaires avec du tampon PBS pour éliminer les principales contaminations de surface, les villosités du chorion sont grattées puis mises à semer en milieu de culture.

d) Isolement de *Campylobacter fetus*

i) *Milieu de culture pour isolement*

De nombreux milieux sont couramment utilisés pour l'isolement bactériologique de la campylobactériose génitale bovine. Il convient de remarquer que plusieurs milieux utilisés pour l'isolement de *Campylobacter* spp. ne conviennent pas pour l'isolement de *C. fetus* du fait des produits anti-microbiens (par ex. les céphalosporines) qui pourraient inhiber sa croissance (24). La plupart des milieux contiennent de la cycloheximide. En raison de sa toxicité potentielle, cet agent anti-fongique peut être remplacé par de l'amphotéricine B. Le milieu sélectif recommandé pour l'isolement de *C. fetus* est le milieu de Skirrow. La base de ce milieu est un milieu au sang (avec 5 à 7 % de sang défibriné [lysé]) et contient des agents sélectifs : sulfate de polymyxine B (2,5 UI/ml), du triméthoprim (5 µg/ml), de la vancomycine (10 µg/ml) et de la cycloheximide (50 µg/ml).

Une autre solution consiste en un milieu au sang (5 à 7 %) non sélectif en association avec une filtration (0,65 µm). Cependant, comparée à la méthode du milieu sélectif, elle peut être moins sensible.

Des contrôles de qualité doivent être réalisés sur chaque lot de milieu en utilisant des souches de référence.

ii) *Conditions d'incubation*

Les boîtes sont mises à incuber à 37 °C dans des conditions de micro-aérobiose, à savoir 5 à 10 % d'oxygène, 5 à 10 % de dioxyde de carbone et préférentiellement 5 à 9 % d'hydrogène, pour une croissance optimale (26). Ces conditions d'incubation en atmosphère micro-aérobie peuvent être obtenues par différentes méthodes. Certains laboratoires utilisent des récipients avec évacuation répétée des gaz et remplacement de l'atmosphère par utilisation de bouteilles de gaz spécifiques. Des kits pour la production de gaz sont disponibles dans le commerce. Des incubateurs spécifiques, permettant de reproduire différentes atmosphères, peuvent également être utilisés.

Les conditions de culture et d'incubation sont systématiquement contrôlées en utilisant des souches contrôles connues de *C. fetus* subsp. *fetus* et *C. fetus* subsp. *venerealis*. De tels témoins doivent être réalisés pour chaque essai de mise en culture.

e) **Identification des espèces de *Campylobacter***

i) *Morphologie des colonies*

Les colonies de *C. fetus* apparaissent normalement en milieu de culture après 2 à 5 jours. Pour éviter le masquage des colonies spécifiques par des bactéries contaminantes, il est recommandé de vérifier tous les jours la culture et de sous cloner les bactéries suspectées d'être *C. fetus*. Après 3 à 5 jours d'incubation, les colonies positives mesurent entre 1 et 3 mm de diamètre. Elles sont légèrement gris rosées, rondes, convexes, lisses et brillantes et à bords réguliers.

ii) *Morphologie au microscope*

Campylobacter est une bactérie mobile mais cette propriété peut disparaître lors de passages en cultures. *Campylobacter* prend souvent la forme d'un fin bacille incurvé de 0,3 à 0,4 µm de large et de 0,5 à 8 µm de long. Des formes courtes (en forme de virgule), moyennes (en forme de S) et longues (hélice à plusieurs spirales) peuvent être observées simultanément à l'état frais. Les bactéries sont systématiquement séparées les unes des autres. Les cultures anciennes peuvent contenir des bactéries de type coccus.

iii) *Tests biochimiques* : voir tableau 1

iv) *Atmosphère* : *Campylobacter* ne pousse pas en conditions aérobies

f) **Identification immunologique de *Campylobacter fetus***

La technique d'immunofluorescence (IF) peut être utilisée pour identifier directement la bactérie ou pour confirmer l'identification d'une souche après isolement. Elle ne permet pas de différencier les différentes sous-espèces.

i) *Préparation des sérums immuns*

Des souches de *Campylobacter*, de préférence des souches de référence provenant de collections reconnues (*C. fetus* subsp. *venerealis* ou *C. fetus* subsp. *fetus*), sont cultivées séparément sur gélose au sang dans des conditions micro-aérobies à 37 °C pendant 3 jours. Les bactéries sont suspendues dans du PBS, pH 7,2 et lavées 2 fois par centrifugation. Des lapins âgés de 3 mois sont inoculés par voie intramusculaire avec 2 ml d'une suspension contenant 10¹¹ bactéries/ml de sous-espèces de *C. fetus* dans du PBS, mélangée à de l'adjuvant incomplet de Freund. L'inoculum est injecté dans 4 sites, à raison de 0,5 ml par site. Des prélèvements sanguins sont réalisés sur les animaux avant inoculation puis toutes les semaines. Quand les titres de sérum atteignent un plateau (détection par un test d'agglutination ou d'immunofluorescence), 0,1 à 1 ml d'une solution de 10¹⁰ bactéries vivantes/ml est injecté par voie intraveineuse aux lapins. Le sérum est récupéré 7 jours plus tard par saignée des lapins. Les sérums hétérologues sont mélangés. Dans une étude récente, un conjugué préparé à partir d'IgY de poulet a été proposé comme alternative aux sérums de lapin. Des anticorps monoclonaux ont été décrits, qui peuvent être utilisés pour le diagnostic immunologique de *C. fetus* (2).

ii) *Préparation des conjugués*

Les conjugués sont préparés comme décrit par Harlow *et al.* (9). La dilution de travail du conjugué doit être déterminée par titrage en échiquier sur des frottis de culture de *C. fetus* en testant différentes dilutions de contrôle positif et négatif. La concentration de travail correspond au double de la concentration minimale qui produit une fluorescence nette avec les colonies de *C. fetus*.

iii) *Préparation des échantillons*

Les liquides génitaux (smegma préputial, mucus vaginal) ou le contenu de l'estomac du fœtus sont rincés dans environ 5 ml de PBS à 1 % de formol. Deux centrifugations sont réalisées : d'abord les échantillons sont centrifugés à 600 *g* pendant 10 min à 4 °C pour éliminer les débris, puis le surnageant est centrifugé à 8 000 *g* pendant 30 min à 4 °C. Le culot est dissout dans 100 µl de surnageant restant.

iv) *Test d'immunofluorescence (14)*

Les prélèvements (20 µl) sont fixés sur deux lames de microscope. Les lames sont séchées à l'air et fixées à l'acétone à –20 °C pendant 30 min ou à l'éthanol entre 18 et 25 °C pendant 30 min. Les lames sont séchées à l'air et l'antisérum conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine est ajouté à la dilution appropriée. La coloration est réalisée à l'obscurité en chambre humide pendant 30 min à 37 °C. Par la suite, les lames sont lavées 3 fois en tampon PBS (10 min pour chaque lavage). Elles sont ensuite montées en tampon glycérol (90 % [v/v] glycérol : 10 % PBS). Les lamelles sont posées pour éviter le dessèchement et les lames sont examinées sous microscope à fluorescence (lampe ultraviolet) au microscope à épi-fluorescence. Des lames témoins positives et négatives doivent être utilisées à chaque test. Les souches de référence de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* et de *C. fetus* subsp. *fetus* sont utilisées comme témoin positif, et des souches d'autres espèces de *Campylobacter* comme témoin négatif. Les échantillons présentant des bactéries fluorescentes avec la morphologie typique de *C. fetus* sont considérés comme positif.

g) *Identification biochimique des sous-espèces de Campylobacter fetus*

Ces tests (voir Tableau 1) doivent être réalisés à partir de cultures pures.

Tableau 1. Caractéristiques différentielles des espèces de *Campylobacter* qui peuvent être isolées du tractus génital de bovin et d'avortons (d'après le *Manuel de Bergey*, 2^{ème} édition, 2005)

	25 °C	42 °C	Oxydase	Catalase	NaCl 3,5 %	Glycine 1 %	H ₂ S ^(b)	Acide Nalidixique
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	V	–	+	V	–	–	–	V
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	+	V ^(a)	+	+	–	+	–	R
<i>C. jejuni</i>	–	V ^(c)	+	V ^(d)	–	V	–	S ^(e)
<i>C. hyointestinalis</i>	–	+	+	+	–	V	V	R
<i>C. sputorum</i>	–	+	+	V	+	+	+	V

(a) = bien que *C. fetus* n'appartiennent pas aux *Campylobacter* spp. thermophiles, un grand nombre de souches de cette espèce cultive à 42 °C ; (b) = sur milieu gélosé lactosé, saccharosé et glucosé au citrate de fer ammoniacal (triple sugar iron agar medium) ; (c) = *C. jejuni* subsp. *jejuni* est positif, *C. jejuni* subsp. *doylei* est négatif ; (d) = *C. jejuni* subsp. *jejuni* est positif, *C. jejuni* subsp. *doylei* est variable ; (e) = selon le *Manuel de Bergey* les souches sont sensibles, mais des souches résistantes ont été fréquemment décrites ; (+) = réaction positive ou croissance et (–) = réaction négative ou absence de croissance de la souche sur milieu approprié et sous conditions de culture spécifique (voir Section B.1.d ii) ; V = résultats variables ; S = sensible ; R = résistant.

i) *Croissance à 25 °C et à 42 °C*

Une suspension bactérienne (~McFarland n°1) est ensemencée sur deux boîtes de milieu au sang. Chaque boîte est incubée dans les conditions atmosphériques spécifiées (voir Section B.1.d ii) à 25 °C et 42°C. Des souches témoins sont testées en parallèle.

ii) *Oxydase et catalase*

Les tests sont réalisés selon les protocoles bactériologiques normalisés. Des souches témoins sont testées en parallèle.

iii) *Croissance en présence de chlorure de sodium*

Une suspension bactérienne est ensemencée dans des milieux au sang contenant 3,5 % de NaCl (15 ml de milieu au sang + 2,04 ml d'une solution 5 M de NaCl), et dans des milieux au sang sans NaCl. L'incubation est faite dans les conditions atmosphériques spécifiées (voir Section B.1.d ii). Des souches témoins sont testées en parallèle.

iv) *Test de croissance en présence de 1 % de glycine*

Une suspension bactérienne (~McFarland n°1) est ensemencée sur un milieu glycine (15 ml de milieu sanguin + exactement 1,65 ml de solution aqueuse de glycine à 10 %, stérilisée par filtration) et sur le même milieu sans glycine. L'incubation est réalisée dans les conditions atmosphériques spécifiées

(voir Section B.1.d ii). Deux souches témoins (*subsp. venerealis* et *fetus*) sont testées en parallèle. Dans la mesure où les souches sont délicates à manipuler, des changements minimes dans le milieu peuvent être importants et l'absence de croissance en présence de glycine doit être considérée uniquement comme une présomption de *C. fetus* subsp. *venerealis*. La reproductibilité du test est faible et des souches à caractère intermédiaire ont été décrites (18).

v) *Test de production de sulfite d'hydrogène en milieu TSI*

Le test au sulfite d'hydrogène (H₂S) est réalisé sur milieu agar lactosé, saccharosé et glucosé au citrate de fer ammoniacal (TSI pour *triple sugar iron agar*) composé de peptone (20 g/litre), d'extrait de viande (3 g/litre), de chlorure de sodium (5 g/litre), de citrate de fer (0,5 g/litre) de thiosulfate de sodium (Na₂S₂O₃) (0,5 g/litre), de lactose (10 g/litre), de sucrose (10 g/litre), de glucose (1 g/litre), de rouge phénol (0,024 g/litre), d'agar (11 g/litre) et d'eau distillée (qsp 1 000 ml). Ce milieu est distribué dans des tubes puis stérilisé à 115 °C pendant 15 min et mis à refroidir inclinés de façon à obtenir une pente. Il peut être préparé à la demande ou être conservé en conditions classiques pendant environ 3 semaines. Une suspension bactérienne (~McFarland n°1) est ensemencée sur la pente et dans la gélose à l'aide d'une anse de platine. Un changement de couleur du rouge au noir indique une production de H₂S. Des souches témoins sont testées en parallèle.

vi) *Test de production de sulfite d'hydrogène en milieu cystéine* (non inclus dans le tableau 1)

Le test H₂S est réalisé en bouillon Brucella contenant 0,02 % de cystéine. La production de H₂S est détectée par une bandelette d'acétate de plomb attachée à l'intérieur du tube. Une suspension bactérienne (~McFarland n°1) est ensemencée dans le milieu. Un noircissement de la bandelette est considéré comme une réaction positive. Des souches témoins sont testées en parallèle.

vii) *Test de sensibilité à la céphalothine et à l'acide nalidixique*

La sensibilité à la céphalothine (CN) et à l'acide nalidixique (AN) est testée par la méthode des disques contenant chacun 30 µg de CN ou AN.

Lors du test, des cultures de 72 h des différentes souches sont mises en suspension dans du PBS à la concentration de 10⁹ bactéries/ml. À partir de cette suspension, 100 µl sont déposés sous forme d'une couche égale sur un milieu de gélose sanguine basique. Les boîtes de gélose sont déshumidifiées avant le dépôt de la culture bactérienne sur la surface. Les disques de sensibilité sont ensuite placés sur les dépôts de bactéries. Les cultures sont incubées à 37 °C dans les conditions atmosphériques spécifiées (voir Section B.1.d ii), et examinées après 48 et 72 h. Une zone d'inhibition d'au moins 3 mm autour du disque indique que la souche testée est sensible à l'antibiotique. Toutes les souches de *C. fetus* subsp. *fetus* et la plupart des souches de *C. fetus* subsp. *venerealis* sont résistantes au AN (16). Toutes les souches de *C. fetus* sont sensibles au CN (16).

h) Identification moléculaire des sous-espèces de *Campylobacter fetus*

Plusieurs méthodes moléculaires pour l'identification des sous-espèces de *C. fetus* ont été décrites, notamment le séquençage du gène 16S (8, 17), la PFGE (17), l'AFLP (29), et la MLST (23). Cependant, la plupart de ces méthodes sont longues à mettre en œuvre, nécessitent du matériel coûteux et de l'expérience. Les laboratoires de diagnostic pourront utiliser plus facilement la PCR. Plusieurs méthodes de PCR sont réputées spécifiques de la sous-espèce en particulier celles mises au point par Hum *et al.* (12), Wang *et al.* (30) et, plus récemment, par Tu *et al.* (22) et Van Bergen *et al.* (25).

La technique de PCR multiplex décrite par Hum *et al.* (12) est la plus couramment citée. Elle permet l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique de *C. fetus* (plus petit d'environ 200 pb que le fragment de 960 pb décrit dans la publication d'origine), ainsi qu'un fragment spécifique de *C. fetus* subsp. *venerealis*. Cette technique de PCR multiplex permet donc la différenciation des deux sous-espèces (un produit d'amplification pour *C. fetus* contre deux produits d'amplification pour *C. fetus* subsp. *venerealis*). Les souches de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius* n'ont pas été incluses dans l'étude de validation de la PCR de Hum, mais des isolats identifiés comme appartenant au biovar *intermedius* par AFLP, sont classés grâce à la PCR de Hum soit comme *C. fetus* subsp. *fetus* soit comme *C. fetus* subsp. *venerealis* (23). La comparaison de la méthode PCR avec l'AFLP et la MLST (23) ou avec le test à la glycine (31) confirme que la PCR peut donner de faux résultats positifs ou négatifs.

La technique de PCR décrite par Wang *et al.* (30) ne révèle qu'un produit spécifique de *C. fetus* subsp. *fetus*. Ces résultats n'ont été obtenus que sur un nombre très limité de souches. L'évaluation récente de ses performances sur un plus grand nombre d'échantillons a donné des résultats à la fois faux positifs et faux négatifs en ce qui concerne la différenciation des sous-espèces (25).

Les techniques d'amplification au hasard de l'ADN polymorphique (RAPD pour *random amplification of polymorphic DNA*) décrites par Tu *et al.* (22) ont été publiées récemment et n'ont été évaluées que sur un petit nombre de souches de *C. fetus* subsp. *venerealis*. Leurs performances devront être évaluées sur un plus grand nombre de souches.

La technique de PCR décrite récemment par Van Bergen et al. (25) a montré une parfaite concordance avec l'AFLP pour l'identification de *C. fetus* subsp. *venerealis* et est donc considérée comme la meilleure méthode actuellement disponible pour la détection de *C. fetus* subsp. *venerealis*. Cependant, cette technique ne reconnaît pas les souches définies par l'AFLP comme étant *C. fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius*.

2. Épreuves sérologiques/détection d'anticorps

Un test ELISA est disponible pour détecter les IgA sécrétoires spécifiques dans le mucus vaginal après avortement dû à *C. fetus* subsp. *venerealis*. Ces anticorps sont persistants et leur concentration reste constante plusieurs mois dans le mucus vaginal (13).

Le premier prélèvement doit être réalisé après la période d'involution (en général 1 semaine après l'avortement) quand le mucus vaginal devient clair.

Un test ELISA pour la détection d'une réponse humorale sérique en IgG après vaccination a été décrit.

a) Préparation de l'antigène et adsorption sur plaque

Des cultures de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* sont récupérées dans du PBS à 0,5 % de formol pendant 1 h, centrifugées à 17 000 g, lavées 2 fois dans du PBS, puis re-suspendues dans du tampon carbonate 0,05 M à pH 9,6. La densité finale est ajustée à 0,21 à 610 nm ($DO_{610\text{ nm}} = 0,21$). Des plaques de titrage en polystyrène à fond plat, sensibilisées avec 10 µl d'antigène sont mises à incuber à 4 °C pendant la nuit, puis stockées à -20 °C. Avant utilisation, les plaques sont rincées 2 fois à l'eau distillée et légèrement tapotées pour éliminer l'humidité.

• Protocole

- i) Ajouter le mucus vaginal dilué (100 µl) à chaque puits et incuber la plaque à 37 °C pendant 2 h. Laver les plaques comme précédemment et ajouter 100 µl de sérum de lapin anti IgA bovine. Après 2 h d'incubation à 37 °C, laver les plaques et ajouter dans chaque puits 100 µl de sérum de chèvre anti IgG de lapin, couplé à la peroxydase de raifort. Après 2 h d'incubation à 37 °C, laver les plaques, ajouter 100 µl de substrat (0,8 mg/ml d'acide 5 amino-salicylique, pH 6,0) et activer le substrat par l'ajout immédiat de peroxyde d'hydrogène 1 M, 0,2 % [H_2O_2]). Laisser les plaques à température ambiante pendant 30 min, arrêter la réaction par addition de 50 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) 3 M. L'absorbance est mesurée sur lecteur de plaque ELISA à 450 nm. Chaque échantillon est éprouvé en double et des témoins positif et négatif sont réalisés sur chaque plaque. Les mesures de densité optique (DO) du test sont corrigées par rapport à celles des témoins positif et négatif selon la formule suivante :

$$\text{Résultat} = \frac{DO_{\text{échantillon}} - DO_{\text{témoin négatif}}}{DO_{\text{témoin positif}} - DO_{\text{témoin négatif}}} \times 100$$

Le test est positif si le résultat est supérieur à 40. Les animaux vaccinés ne répondent pas à ce test ELISA IgA car leur mucus ne contient que des anticorps d'isotype IgG.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Deux groupes d'antigènes de *C. fetus* sont reconnus par le système immunitaire : les antigènes flagellaires thermolabiles « H » et les antigènes somatiques thermostables « O ». En outre, un antigène capsulaire « K » doit être présent. L'antigène K est rapidement détruit dans les conditions *in vitro*. Les vaccins doivent nécessairement contenir ces différents antigènes. D'autres préparations vaccinales ont été décrites (5). Un vaccin expérimental contre *C. fetus* subsp. *fetus* induit une immunité contre *C. fetus* subsp. *venerealis* car les souches partagent des antigènes communs (1). Cependant, l'ajout d'une seconde souche de *C. fetus* subsp. *venerealis* dans le produit biologique est largement pratiqué et fortement recommandé. La présence de 4 à 5 glycoprotéines thermosensibles, immunogènes et communes à plusieurs souches de *C. fetus* subsp. *venerealis* et *C. fetus* subsp. *fetus* est essentielle pour un vaccin efficace. Leurs présences doivent être confirmées. La concentration du vaccin (poids sec) doit être d'environ 40 mg de protéine par dose afin d'obtenir un bon niveau de protection.

Dans les troupeaux infectés, tous les bovins d'élevage (taureaux, vaches et génisses) doivent être vaccinés 2 fois avant la saison de monte. Dans la plupart des cas, le vaccin réduit la durée d'infection mais les vaches peuvent rester infectées d'une saison à l'autre. Les taureaux nécessitent aussi 2 doses vaccinales par an, car il est

possible que le vaccin ne soit pas toujours efficace lors d'infection en phase terminale. L'année suivante, les taureaux et les génisses de remplacement doivent être vaccinés, et à partir de la 3^e année, les taureaux sont vaccinés annuellement.

Dans les élevages non infectés, seuls les taureaux sont vaccinés 1 fois par an, avec deux doses à 21 jours d'intervalle (2 semaines avant le début de la saison de monte).

1. Gestion des semences bactériennes

a) Caractéristiques de la semence bactérienne

La semence consiste en une production homogène et importante d'une culture de *C. fetus* subsp. *fetus* ou *C. fetus* subsp. *venerealis*, qui a été caractérisée de manière précise quant à sa pureté et son identité et qui a été conservée en petites fractions aliquotes.

b) Méthode de culture

La croissance initiale de la semence est obtenue en milieu semi-solide. C'est un milieu basique additionné de 0,16 % d'agar. Le milieu de base est composé d'un milieu de croissance Brucella (2,8 %), d'extrait de levure (0,5 %), de succinate de sodium (1,2 %), et de chlorure de calcium (0,001 %). Ce milieu initial est conservé 3 jours à 37 °C dans les conditions atmosphériques spécifiées (voir Section B.1.d.ii.). La culture bactérienne en croissance est transférée dans des tubes supplémentaires contenant le milieu semi-solide et incubée pendant 48 h. La culture bactérienne en croissance qui en résulte est utilisée pour la production de vaccins.

Cette culture est conservée à 4 °C.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

La semence bactérienne doit être indemne d'organismes de contamination. Sa pureté doit être vérifiée par une méthode valide de mise en culture.

Il n'est pas facile de tester l'efficacité du vaccin dans des conditions de laboratoire. L'efficacité est évaluée sur le terrain sur base d'observations épidémiologiques.

2. Méthode de fabrication

La culture bactérienne initiale estensemencée dans un milieu de culture composé d'un milieu de base additionné de 0,025 % de thioglycollate. Ces cultures sont incubées à 37 °C pendant 24 h sous agitation à 80 tours/min. Les liquides sont récupérés et du formol est ajouté à une concentration finale de 0,2 % (0,74 g/litre).

Le vaccin est mélangé à un adjuvant sous forme d'émulsion huileuse pour allonger la période d'immunité.

3. Contrôle en cours de fabrication

L'identité de la bactérie du lot doit être vérifiée par mise en culture et identification, de même que l'absence de germes contaminants.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et d'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

Le processus d'inactivation doit être total et la méthode de vérification de l'inactivation doit être validée avant son emploi. L'inactivation est vérifiée par l'inoculation de l'équivalent d'une dose de vaccin préparé sur le même milieu et dans les mêmes conditions que celles définies lors du processus de production. Cette culture est incubée pendant 72 h dans les mêmes conditions. Après ce temps il ne doit y avoir aucune évidence de croissance bactérienne. Le produit final doit aussi être indemne de bactéries vivantes et de contaminants fongiques lors de tests de culture appropriés.

Deux cobayes sont inoculés avec 2 ml de produit, soit par voie intramusculaire, soit par voie sous-cutanée. Ils ne doivent pas présenter de réactions, attribuables au vaccin, pendant les 7 jours d'observation qui suivent l'inoculation.

c) Activité

La capacité du vaccin à induire une réponse humorale est testée chez le lapin par mesure de la séroconversion. Les titres de sérum sont mesurés par immunofluorescence ou par un test d'agglutination. Cinq lapins séronégatifs, à la dilution de sérum 1/100, sont vaccinés par voie sous-cutanée avec la moitié de la dose utilisée chez les bovins à raison de 2 injections à 14 jours d'intervalle. Le sérum d'au moins 4 lapins, récolté 14 jours après la seconde injection, doit montrer une augmentation du titre en anticorps d'un facteur 4.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir section C.4.b.

b) Activité

Voir section C.4.C.

• **Remerciements**

Certaines parties de ce chapitre ont été inspirées ou reproduites à partir du chapitre sur la campylobactériose génitale bovine du *Manuel terrestre* des éditions préalables. Les auteurs sont reconnaissants au Dr. C. Campero (Argentine) pour les échanges fructueux qu'ils ont pu avoir avec lui.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BOUTERS R., DE KEYSER J., VANDEPLASSCHE M., VAN AERT A., BRONE E. & BONTE P. (1973). *Vibrio fetus* infections in bulls: curative and preventive vaccination. *Br. Vet. J.*, **129**, 52–57.
2. BROOKS B.W., ROBERTSON R.H., LUTZE-WALLACE C.L. & PFAHLER W. (2002). Monoclonal antibodies specific for *Campylobacter fetus* lipopolysaccharides. *Vet. Microbiol.*, **87**, 37–49.
3. CAMPERO C.M., MOORE D.P., ODEON A.C., CIPOLLA A.L. & ODRIOSOLA E. (2003). Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet. Res. Commun.*, **27**, 359–369.
4. CLARKE B.L. & DUFTY J.H. (1978). Isolation of *Campylobacter fetus* from bulls. *Aust. Vet. J.*, **54**, 262–263.
5. CLARKE B.L., DUFTY J.H. & MONSBOURGH M.J. (1972). Immunisation against bovine vibriosis. 1. Comparison of the protective properties of bacterins prepared by two methods. *Aust. Vet. J.*, **48**, 376–381 and 382–384.
6. GARCIA M.M., EAGLESOME M.D. & RIGBY C. (1983). Campylobacters important to veterinary medicine. *Vet. Bull.*, **53**, 793–818.
7. GARCIA M.M., STEWART R.B. & RUCKERBAUER G.M. (1984). Quantitative evaluation of a transport-enrichment medium for *Campylobacter fetus*. *Vet. Rec.*, **115**, 434–436.
8. GORKIEWICZ G., FEIERL G., SCHÖBER C., DIEBER F., KÖFER J., ZECHNER R. & ZECHNER E.L. (2003). Species-specific identification of Campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2537–2546.
9. HARLOW E. & LANE D. (1988). Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, USA.
10. HARVEY S.M. & GREENWOOD J.R. (1983). Relationship among catalase-positive Campylobacters determined by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridisation. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**, 275–284.

11. HUM S., BRUNNER J., MCINNES A., MENDOZA G. & STEPHENS J. (1994). Evaluation of cultural methods and selective media for the isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from cattle. *Aust. Vet. J.*, **71**, 184–186.
12. HUM S., QUINN K., BRUNNER J. & ON S.L.W. (1997). Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust. Vet. J.*, **75**, 827–831.
13. HUM S., STEPHENS L.R. & QUINN C. (1991). Diagnosis by ELISA of bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. *Aust. Vet. J.*, **68**, 272–275.
14. MELICK P. W., WINTER A.J. & MCENTEE K. (1965). Diagnosis of vibriosis in the bull by use of the fluorescent antibody technic. *Cornell Vet.*, **55**, 280–294.
15. MONKE H.J., LOVE B.C., WITTUM T.E., MONKE D.R. & BYRUM B.A. (2002). Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J. Vet. Invest.*, **14**, 35–39.
16. ON S.L.W. (1996). Identification methods for Campylobacters, Helicobacters and related organisms. *Clin. Microb. Rev.*, **9**, 405–422.
17. ON S.L.W. & HARRINGTON C.S. (2001). Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16s rDNA sequencing methods. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 285–293.
18. SALAMA S.M., GARCIA M.M. & TAYLOR D.E. (1992). Differentiation of the subspecies of *Campylobacter fetus* by genomic sizing. *Int. J. Syst. Bact.*, **42**, 446–450.
19. SEBALD M. & VERON M. (1963). Base DNA Content and Classification of *Vibrios*. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, **105**, 897–910.
20. TEDESCO L.F., ERRICO F. & DEL BAGLIVI P.L. (1977). Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.*, **53**, 470–472.
21. THOMPSON S.A. & BLASER M.J. (2000). Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. In *Campylobacter*, Second Edition, I. Nachamkin & Blaser M.J., ed. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA, 321–347.
22. TU Z.C., EISNER W., KREISWIRTH B.N. & BLASER M.J. (2005). Genetic divergence of *Campylobacter fetus* strains of mammal and reptile origins. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 3334–3340.
23. VAN BERGEN M.A.P., DINGLE K.E., MAIDEN M.C., NEWELL D.G., VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L., VAN PUTTEN J.P. & WAGENAAR J.A. (2005). Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5888–5898.
24. VAN BERGEN, M.A.P., LINNANE S., VAN PUTTEN J.P. & WAGENAAR J.A. (2005). Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 1017–1026.
25. VAN BERGEN M. A. P., SIMONS G., VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L., VAN PUTTEN J.P., ROMBOUT J., WESLEY I. & J. WAGENAAR A. (2005). Amplified fragment length polymorphism based identification of genetic markers and novel PCR assay for differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *J. Med. Microbiol.*, **54**, 1217–1224.
26. VANDAMME P. (2000). Taxonomy of the family Campylobacteraceae. In: *Campylobacter*, Second Edition Nachamkin I. & Blaser M.J., eds. ASM Press, Washington DC, USA, 3–26.
27. VANDAMME P., POT B., FALSEN E., KERSTERS K. & DE LEY J. (1990). Intra- and interspecific relationships of veterinary *Campylobacters* revealed by numerical analysis of electrophoretic protein profiles and DNA:DNA hybridizations. *System. Appl. Microbiol.*, **13**, 295–303.
28. VÉRON M. & CHATELAIN R. (1973). Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **23**, 122–134.

29. WAGENAAR J.A., VAN BERGEN M.A.P., NEWELL D.G., GROGONO-THOMAS R. & DUIM B. (2001). Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2283–2286.
30. WANG G., CLARK C.G., TAYLOR T.M., PUCKNELL C., BARTON C., PRICE L., WOODWARD D.L. & RODGERS F.G. (2002). Colony multiplex PCR assay for the identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 4744–4747.
31. WILLOUGHBY K., NETTLETON P.F., QUIRIE M., MALEY M.A., FOSTER G., TOSZEGHY M. & NEWELL D.G. (2005). A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* -species *venerealis*: use on UK isolates of *C. fetus* and other *Campylobacter* spp. *J. Appl. Microbiol.*, **99**, 758–766.

*
* *

N.B. : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la campylobactériose génitale 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).

ENCÉPHALOPATHIE SPONGIFORME BOVINE

RÉSUMÉ

L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) est une maladie neurologique fatale des bovins adultes qui a été reconnue pour la première fois en Grande-Bretagne (GB) en 1986. Il s'agit d'une encéphalopathie spongiforme transmissible ou « maladie à prion ». L'archétype de ce groupe de maladies est la tremblante du mouton et de la chèvre (voir Chapitre 2.7.13., « Tremblante »).

L'épizootie de l'ESB peut être expliquée par l'exposition orale à un agent apparenté à celui de la tremblante présent dans les protéines dérivées de ruminants issues des farines de viandes et d'os incorporées dans les concentrés ou les compléments alimentaires de marques déposées. Les cas initiaux d'ESB dans quelques pays sont considérés comme étant le résultat d'exportations depuis la GB de bétail infecté ou de farines de viandes et d'os contaminées, bien que des exportations depuis d'autres pays soient à présent impliquées. Dans d'autres pays, les cas initiaux sont clairement indigènes, sans lien évident avec des farines de viandes et d'os importées, suggérant que des cas antérieurs, non détectés, ont pu survenir. Suite aux mesures de contrôles, les épizooties dans beaucoup de pays sont sur le déclin. Des cas d'ESB surviennent actuellement dans toute l'Europe et sont aussi détectés à présent en Asie et en Amérique du Nord.

La transmissibilité expérimentale de l'ESB au bovin a été démontrée suite à des expositions parentérale et orale à des tissus cérébraux de bovins affectés. L'agent de l'ESB est considéré comme étant la source commune des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) par voie orale dans quelques autres espèces de ruminants et dans des espèces de félinés. Il existe un lien causal prouvé entre l'agent de l'ESB et un variant de la forme humaine d'EST, la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJv). Les recommandations concernant les précautions de sécurité pour la manipulation de matériels infectés par l'ESB considèrent à présent l'ESB comme une zoonose et un confinement de catégorie 3 (avec dérogation) a été attribué.

Identification de l'agent pathogène : *L'ESB, telle qu'elle s'est manifestée en GB, possédait un pic d'incidence chez les bovins âgés de 4 à 5 ans. L'évolution clinique est variable mais peut s'étendre sur plusieurs mois. Les signes cliniques manifestes sont suffisamment distinctifs pour conduire à une suspicion de maladie, en particulier si les diagnostics différentiels ont été éliminés. Les signes cliniques précoces peuvent être subtils et ne concernent en général que le comportement, et peuvent conduire à l'élimination de l'animal atteint avant que la suspicion d'ESB ne soit portée. Dans les pays où il existe une police sanitaire de la maladie, les cas de suspicions cliniques doivent être abattus, le cerveau examiné et la carcasse détruite. À l'heure actuelle, une surveillance active est mise en place dans la plupart des pays pour identifier les animaux infectés sans signes cliniques ou avant qu'ils n'apparaissent. Aucune épreuve de diagnostic pour l'agent de l'ESB chez l'animal vivant n'est à ce jour disponible. La nature des agents responsables des EST n'est pas clairement établie. Une isoforme de la protéine membranaire PrP^C (dénommée auparavant PrP^{Sc}, PrP pour Protéine Prion), incorrectement repliée sur elle-même, partiellement résistante aux protéases et spécifique de la maladie a une importance critique dans la pathogénie de ces maladies, et selon l'hypothèse du prion, est la composante principale, voire la seule, de l'agent infectieux. La confirmation du diagnostic d'encéphalopathie spongiforme, réalisée auparavant par examen histologique du cerveau est maintenant réalisée par examen immunohistochimique (IHC) et/ou immunochimique du cerveau pour détecter la PrP^{Sc}. La PrP^{Sc} peut être détectée, dans des régions anatomiques précises du système nerveux central des bovins infectés, par des méthodes IHC sur du matériel fixé au formol ou par immuno-empreinte et d'autres épreuves enzymatiques sur des extraits de cerveau non fixés.*

La transmission à partir de tissu cérébral infecté à des souris (normales ou transgéniques) est la seule méthode pratique actuellement disponible pour la détection de l'infectivité ; elle est aussi

importante dans la confirmation du diagnostic ou la caractérisation des souches de l'agent infectieux. Des formes atypiques ou variantes de l'ESB ont été décrites dans tous les continents qui ont connu les formes classiques de l'ESB. Bien que la majorité des phénotypes atypiques soit reconnue sur la base des profils des bandes en western blot, la caractérisation de certains isolats par des épreuves biologiques met de plus en plus en évidence une diversité des souches dans le cas de maladies à prion apparaissant dans les conditions naturelles chez les bovins.

Épreuves sérologiques : des réponses immunitaires spécifiques n'ont pas été détectées au cours des EST.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : aucun vaccin ni aucun produit biologique ne sont disponibles actuellement. Des kits de diagnostic commerciaux pour l'ESB sont disponibles et utilisés pour le diagnostic de l'ESB dans de nombreux pays.

A. INTRODUCTION

L'ESB est une maladie invariablement fatale des bovins domestiques, dont les cas ont été reconnus en premier lieu en Grande-Bretagne (GB) en Novembre 1986 (27, 37). Il a été montré que l'ESB appartient à ce groupe de désordres désignés sous le nom d'encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) ou maladies à prion, et dont la maladie-type chez l'animal est la tremblante du mouton. Ces maladies sont définies par une accumulation pathologique, principalement dans le système nerveux central (SNC), mais aussi dans les tissus lymphoréticulés et nerveux périphériques, d'une isoforme hautement conservée anormale (incorrectement repliée), partiellement résistante aux protéases, d'une protéine codée par l'hôte (PrP^C), désignée au début sous le nom de PrP^{Sc}. La fonction de la PrP^C n'est pas clairement établie. La PrP^{Sc} est la seule macromolécule spécifique identifiée dans les maladies apparentées à la tremblante. La PrP^{Sc} est aussi également fréquemment désignée par les sigles PrP^{res} pour souligner sa propriété de résistance à la protéinase. PrP^d pour signaler qu'elle est spécifique de la maladie (*d* pour *disease specific*) et PrP^{esb} uniquement pour l'ESB. Dans ce chapitre, le sigle PrP^{Sc} est utilisé de façon générique pour désigner l'isoforme anormale de la PrP^C. L'opinion scientifique actuellement préférée propose que l'agent soit composé entièrement de l'isoforme de PrP spécifique de la maladie et que la forme altérée soit capable d'induire la conversion de la forme normale : l'hypothèse de la protéine seule ou du « prion ». Les données en faveur d'autres hypothèses comme celles d'une origine virale ou bactérienne ou l'implication de facteurs associés tels qu'un déséquilibre minéral restent incertaines. La base moléculaire de la variation de souche est encore peu claire, mais selon l'hypothèse du prion, les caractéristiques des souches sont codées dans les différentes conformations de la protéine prion.

La première caractérisation des isolats d'ESB de Grande Bretagne par transmission à des souris a montré que la vague principale de l'épidémie a été causée par une seule souche principale qui était différente des souches de l'agent de la tremblante chez le mouton (4). L'uniformité des lésions chez la plupart des bovins infectés a aussi donné naissance à la notion d'un phénotype spécifique de l'ESB (7, 30). Le profil des lésions neuro-pathologiques dans les espèces hôtes est important pour la caractérisation phénotypique et, par conséquent, pour la définition d'un cas d'ESB utilisés pour la confirmation de la maladie. Les descriptions depuis 2003 de variations dans les lésions et/ou les caractéristiques moléculaires dans plusieurs pays ont soulevé la question de possibles variations dans les souches de l'agent de la maladie à prion chez les bovins (3, 8, 21, 44). Que de telles observations représentent ou non une réelle variation dans les souches de l'agent de l'ESB, ou différentes formes d'infections à prion chez les bovins reste à démontrer. Étant donné que la détection de la plupart de ces cas est obtenue par surveillance active, il n'existe pas de corrélation avec les signes cliniques, et ils sont basés sur des données obtenues par Western blot (3, 44). La description la plus complète, incluant l'immunohistochimie (IHC), l'histopathologie et la caractérisation par Western blot est celle de deux vieilles vaches en Italie (8). La capacité de transmission de certains isolats aux souris, entraînant des lésions différentes des cas de transmission antérieure a été confirmée (2, 5). Des études de transmission d'autres isolats à partir de bovins sont en cours. Un aspect intéressant commun à presque tous les isolats est qu'ils proviennent de bovins âgés.

Les études épidémiologiques initiales en Grande Bretagne ont établi que l'apparition de l'ESB était sous la forme d'une source épizootique commune et étendue, due à l'infection, via l'alimentation, par un agent similaire à celui de la tremblante dans les farines de viandes et d'os utilisées comme complément alimentaire protéiné (1, 39). Bien que signalée pour la première fois au Royaume-Uni, des cas d'ESB sont apparus, mais avec une plus faible incidence, dans de nombreux pays ; ces foyers impliquaient des bovins importés et/ou des bovins indigènes. Ces cas sont très probablement la conséquence directe ou indirecte de l'exportation de bovins ou de farine de viande infectés en provenance de pays où l'ESB sévissait, y compris le Royaume Uni. Il est évident que l'infection s'est ensuite propagée dans les pays comme cela a été mis en évidence par l'évaluation du risque géographique de l'ESB (GBR pour *Geographical BSE Risk*) réalisée par le Comité scientifique de suivi de l'Union Européenne (13). En fait, dans certains pays, les seuls cas détectés reflètent plutôt des expositions indigènes que des contacts directs avec des aliments contaminés importés (41). L'OIE établit et rend disponible les statistiques actuelles sur l'apparition des foyers d'ESB dans le monde (41).

Il n'existe aucune preuve de transmission horizontale de l'ESB entre bovins et il existe peu de données pour soutenir l'hypothèse d'une transmission maternelle (27). Les études épidémiologiques n'ont révélé aucun risque de transmission par la semence, le lait ou les embryons (27).

Suite à la mise en œuvre de mesures de contrôle, les épizooties au Royaume-Uni et bien d'autres pays ont diminué ou montrent les premiers effets des contrôles sous la forme d'un changement de l'âge spécifique d'incidence. Dans quelques pays, les contrôles ne sont pas mis en place depuis assez longtemps pour que des effets puissent se faire sentir. L'estimation du statut des épizooties en Europe a été améliorée par l'introduction de la surveillance active utilisant les épreuves rapides de diagnostic, qui ont détecté aussi des animaux infectés qui n'avaient pas été reconnus comme cas cliniques suspects. Tandis que la surveillance active peut détecter un certain nombre de cas précliniques, des enquêtes rétrospectives dans les fermes d'origine confirmeront fréquemment que certains signes étaient présents avant l'abattage, mais n'ont pas déclenché la considération d'un diagnostic clinique de l'ESB.

L'apparition nouvelle d'EST dans plusieurs espèces de bovidés et de félidés exotiques en captivité et chez les chats domestiques au cours de l'épizootie d'ESB est attribuée à et, dans des cas spécifiques, est connue pour avoir été causée par l'agent de l'ESB (23). L'exposition est supposée s'être faite via l'alimentation.

Il a aussi été démontré par des épreuves de transmission et des études moléculaires (6, 10) que l'émergence d'une nouvelle forme de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), appelée MCJ variante (MCJv) au Royaume-Uni (40), est liée à l'agent de l'ESB comme agent causal. La voie alimentaire semble être la voie de contamination. Dans le passé, aucune corrélation n'a été établie entre l'exposition des humains aux agents responsables des encéphalopathies spongiformes animales et l'apparition de l'EST humaine et l'ESB constitue donc un précédent en tant qu'EST zoonotique. Il est donc recommandé, à l'heure actuelle, que des précautions d'ordre sanitaire soient prises lors de la manipulation de l'agent de l'ESB sur la base que l'ESB est transmise à l'homme. L'épidémie de MCJv au Royaume-Uni chez des individus qui étaient homozygotes pour MM au codon 129 du gène PrP, a atteint un pic en 2000 ; un petit nombre de cas sont aussi apparus dans d'autres pays.

Suite à l'apparition de cas de MCJv, une approche basée sur l'analyse du risque doit être adoptée quand il est nécessaire d'évaluer le niveau de confinement lors d'autopsies sur des animaux suspects d'être atteints d'ESB ou lors de la manipulation de tissus obtenus à partir de ces animaux ; toute procédure qui pourrait générer des aérosols doit être réalisée en confinement de niveau 3 (voir Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries ») et les laboratoires doivent se conformer aux réglementations nationales de confinement et de biosécurité afin de protéger le personnel d'une exposition à l'agent infectieux. Les procédures de décontamination recommandées peuvent ne pas être complètement efficaces lorsqu'on manipule du matériel présentant un haut titre ou quand l'agent est protégé par de la matière organique séchée. L'inactivation physique recommandée se fait par autoclavage à charge poreuse entre 134 °C et 138 °C pendant 18 min à 30 lb/in². Cependant, les températures de l'extrémité haute de la gamme peuvent être moins efficaces que celles de l'extrémité basse et l'inactivation totale peut ne pas être complète dans certaines conditions, comme lorsque le matériel utilisé lors des épreuves est sous forme d'une macération. La désinfection est réalisée avec de l'hypochlorite de soude contenant 2 % de chlore disponible, ou de l'hydroxyde de sodium 2 N, appliquée pendant plus de 1 h à 20 °C pour les surfaces, ou pendant une nuit complète pour les équipements (33).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

L'ESB clinique, telle qu'elle s'est présentée dans les principales épizooties, peut être observée chez le bovin adulte, et la plupart des cas surviennent chez des animaux âgés de 4 à 5 ans. L'impact des mesures de contrôle s'est traduit avec le déclin du nombre de cas et par une augmentation de l'âge des animaux atteints (27). L'apparition des signes cliniques n'est pas en relation avec les saisons ou une étape du cycle de reproduction. L'ESB a un commencement insidieux et généralement une évolution lente et progressive (24, 38). Occasionnellement, un cas présentera des signes aigus et se détériorera alors rapidement, bien que la fréquence des observations soit un facteur significatif pour déterminer les signes cliniques précoces. Les signes présents, quoique variables, incluent généralement des changements comportementaux, une appréhension et une hyper-réactivité. Par exemple, les vaches malades peuvent être récalcitrantes pour entrer dans la salle de traite ou elles ruent vigoureusement pendant la traite. Chez les vaches tarées en particulier, une incoordination des membres postérieurs et une faiblesse peuvent être les premiers signes cliniques à être notés. Les signes neurologiques prédominant tout le long de l'évolution clinique et peuvent inclure de nombreux aspects d'un état mental et comportemental altérés, des anomalies de posture et de mouvements, une sensibilité aberrante, mais les signes nerveux les plus couramment rapportés sont l'appréhension, l'ataxie des membres postérieurs et l'hyperesthésie au toucher et au son. Le prurit intense caractéristique de certains moutons affectés par la tremblante n'est pas prédominant chez les bovins atteints d'ESB, bien que dans un certain nombre de cas il y ait une activité de frottement et de grattage. Les vaches malades se tiennent parfois debout avec un port de tête bas, l'encolure étendue et les oreilles dirigées vers l'arrière. Les anomalies de la démarche comprennent un fléchissement du

quart pelvien et une hypermétrie des membres postérieurs ; des aspects qui sont le plus aisément appréciés quand le bétail est observé au pâturage. L'ataxie locomotrice peut aussi impliquer les membres antérieurs et avec l'aggravation des signes locomoteurs, une faiblesse généralisée résultant en des chutes et un décubitus, peut dominer le tableau clinique. Des descriptions de diminution de la rumination, ainsi que de bradycardie et un rythme cardiaque altéré, bien qu'étant des signes non spécifiques, suggèrent que la perturbation du système autonome est une caractéristique de l'ESB. Les caractéristiques cliniques générales lors de diminution de la condition générale, perte de poids et diminution de la lactation, accompagnent souvent les signes nerveux alors que la maladie progresse. Le tableau clinique de l'ESB est demeuré inchangé tout au long de l'épizootie au Royaume-Uni (24, 38). Les signes cliniques sont pour l'essentiel similaires dans les autres pays où l'ESB est survenue. L'évolution prolongée de la maladie clinique, s'étendant généralement sur une période de plusieurs semaines à plusieurs mois, peut éventuellement requérir l'abattage pour des considérations de bien-être. Cependant, une police sanitaire pour déterminer le statut de l'ESB d'un pays requiert une notification obligatoire et une enquête diagnostique des cas suspects cliniques, leur abattage et l'examen du cerveau. Au début de la maladie, les signes peuvent être subtils, variables et non spécifiques, et ainsi peuvent empêcher le diagnostic clinique lors de l'examen initial. Une observation continue de tels cas équivoques, en parallèle avec des procédures de pathologie clinique appropriées pour éliminer les diagnostics différentiels, spécialement les désordres métaboliques, permettra d'établir l'essentiel de la progression des signes. Quelques signes cliniques précoces de l'ESB peuvent montrer des similitudes avec les symptômes de la cétose nerveuse, de l'hypomagnésémie, de la listériose encéphalique, et d'autres encéphalites. Des signes subtils peuvent parfois être exacerbés suite à un stress, tel que celui causé par le transport. Des vidéo-clips montrant des bovins atteints d'ESB peuvent être téléchargés à partir du site du Laboratoire de référence des EST de l'Union Européenne (Agence des laboratoires vétérinaires/*Veterinary Laboratories Agency* [VLA]) (15). Des DVD et des cassettes sur les signes cliniques sont aussi disponibles à la même adresse, ainsi que dans d'autres organismes (35).

Le diagnostic de laboratoire de l'ESB a beaucoup évolué du fait de l'accroissement des connaissances sur la maladie et les avancées techniques (17). En l'absence de méthodes d'isolement de l'agent causal *in vitro*, les bases de la confirmation du diagnostic de ce groupe de maladies était, à l'origine, la mise en évidence des caractéristiques morphologiques d'une encéphalopathie spongiforme par examen histopathologique. Par définition, cette méthode reste la seule pour faire le diagnostic de cette pathologie vacuolaire caractéristique. Au début, le diagnostic de l'ESB était basé sur les caractéristiques histopathologiques d'une encéphalopathie spongiforme apparentée à la tremblante et la visualisation en microscopie électronique dans des extraits nettoyés (détergents) de cerveau affecté, de fibrilles caractéristiques, nommées fibrilles associées à la tremblante (SAF), qui sont composées essentiellement de PrP^{Sc}. Le matériel examiné provenait toujours de cas cliniques suspects. En Grande Bretagne, au vu de l'épizootie croissante à la fin des années 1980, le diagnostic histopathologique sur la base de l'examen d'une seule coupe de la moelle allongée (*medulla oblongata*) prise au niveau de l'obex, fut validé par rapport à des examens plus approfondis du tronc cérébral (34). Cette approche simplifiée permettait une modification de l'échantillonnage du cerveau frais ; au lieu de prélever l'intégralité du cerveau, la portion nécessaire était retirée à partir du tronc cérébral à travers le trou occipital, à l'aide d'instruments adaptés. Du fait de la reconnaissance grandissante de la spécificité du diagnostic à l'aide de la PrP^{Sc}, de la disponibilité d'anticorps appropriés et de l'efficacité croissante des méthodes de détection, des méthodes immuno-chimiques spécifiques de la maladie par détection de la PrP (comprenant l'IHC et le Western blot/SAF immuno-empreinte) ont été utilisées en plus de l'histopathologie pour la confirmation du diagnostic. L'introduction de méthodes *in vitro* plus rapides à mettre en œuvre pour la détection de la PrP^{Sc} a conduit au développement de plusieurs tests « rapides » basés pour la plupart sur une épreuve immuno-enzymatique (ELISA) et appliqués sur des sous-échantillons de la moelle allongée ; ces tests sont devenus la principale approche de la surveillance active. Ils permettent un premier dépistage à partir duquel les résultats positifs ou douteux sont soumis à des épreuves de confirmation par IHC ou Western blot. Les stratégies à l'aide de tests rapides sont à l'heure actuelle la principale approche pour la détection des cas et leur utilisation généralisée pour la confirmation a été approuvée dans le principe (15).

L'utilisation d'une méthode particulière dépendra des objectifs pour lesquelles le diagnostic doit être appliqué dans le contexte épidémiologique, et de sa validation pour cette finalité. Cette gamme d'objectifs peut s'étendre depuis la confirmation du diagnostic clinique dans le contrôle de l'épizootie jusqu'au dépistage des populations saines afin de mettre en évidence une maladie masquée ou préclinique. La définition du cas adoptée pourra aussi différer selon que la méthode diagnostique doit être appliquée pour la confirmation d'un cas clinique ou pour le dépistage d'une population. Un soin particulier doit être apporté lors de l'interprétation des données diagnostiques utilisant des méthodologies qui ne permettent pas un recoupement prudent avec les épreuves de référence utilisées pour la confirmation et définies ici. Sans les comparaisons appropriées avec les critères préalablement publiés définissant le phénotype d'ESB en l'absence d'études de transmission, les résultats du diagnostic qui parlent de l'identification d'une nouvelle souche sont peut être prématurés. Le Contrôle Qualité (CQ) et l'évaluation de la qualité (EQ) devraient constituer une part essentielle des protocoles des méthodes de diagnostic. Les Laboratoires de référence de l'OIE sont à disposition pour apporter une assistance dans ce domaine (15, 42). Que les animaux infectés par l'ESB aient été identifiés par surveillance passive ou active, une bonne pratique consiste à détecter et confirmer la maladie par une association d'au moins deux épreuves. La première peut être soit une des épreuves de confirmation décrites ci-dessous, soit un test rapide, mais il importe de réaliser une deuxième épreuve pour confirmer un résultat positif ou douteux. Quand les résultats entre les deux tests sont contradictoires, des épreuves complémentaires (telles que l'immunohistochimie, l'immuno-empreinte sur les fibrilles associées à la tremblante (SAF) ou tout autre épreuve approuvée) doivent

être réalisées ; les échantillons peuvent aussi être envoyés à un Laboratoire de référence de l'OIE pour lever le doute.

a) Préparation du prélèvement

La stratégie d'échantillonnage sera influencée par le statut du pays vis-à-vis de l'ESB, la mise en œuvre de programmes de surveillance active ou passive et les méthodes de diagnostic retenues.

Dans tous les cas de surveillance passive d'une maladie neurologique chez les bovins adultes **où la présence de cas d'ESB dans le pays ou l'État n'a pas été établie ou est de faible incidence**, il est recommandé que les cas cliniques suspects soient l'objet d'une approche neuropathologique classique, dans laquelle les aires représentatives du cerveau complet sont examinées. En outre, le plus grand soin doit être pris pour conserver les échantillons frais ou fixés pour la détection de la PrP^{Sc} par des méthodes immunohistochimiques ou immuno-chimiques. Le non-respect de cette approche pourrait interdire la caractérisation du cas, et de confirmer si oui ou non il s'agit d'ESB typique. Les bovins suspects de cette maladie doivent être euthanasiés par injection intraveineuse d'une solution concentrée de barbiturique. Les tissus cérébraux doivent être prélevés dès que possible après la mort selon les techniques classiques.

Les examens histopathologiques et par IHC sont réalisés en première analyse sur un seul bloc (0,5 à 1 cm de largeur) prélevé dans l'obex de la moelle allongée (Fig. 1a et 1b, niveau A–A représentant le centre du bloc), et qui devrait être choisi pour être fixé pendant au moins 5 jours dans une solution de formol à 4 % (par ex : solution saline formolée à 10 % ou tampon formolé à 10 % [NBF pour *normal buffered formalin*]) puis soumis aux techniques classiques pour les tissus nerveux d'inclusion dans la paraffine.

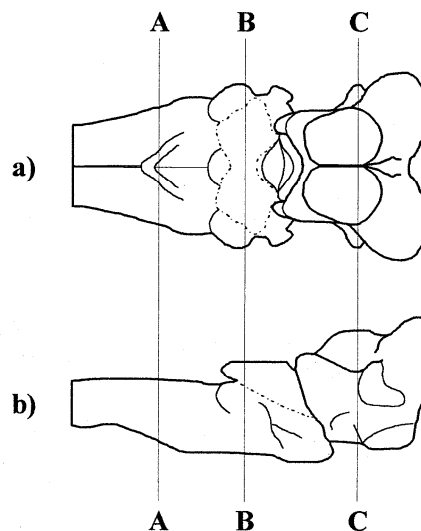


Fig. 1. Tronc cérébral après retrait du cervelet, d'après l'aspect a) dorsal, et b) latéral.

Niveaux recommandés à partir desquels les sections seront prélevées :

A–A = moelle, au niveau de l'obex ; B–B = moelle au niveau des pédoncules cérébelleux caudaux ; C–C = mésencéphale au niveau des collicules rostraux.

Du matériel frais doit aussi être prélevé dès le début pour la détection par immuno-empreinte de la PrP spécifique ; section complète de la moelle (2 à 4 g), soit au niveau rostral soit caudal, à partir de la portion de l'obex prélevé pour fixation. Il est aussi possible de sectionner à moitié la moelle au niveau de l'obex comme cela est décrit ci-dessous pour la surveillance active. Toutes les autres zones du cerveau doivent être sectionnées par une coupe sagittale paramédiane (à 0,5 cm du milieu). La plus petite partie est conservée pour la détection de la PrP^{Sc} par des méthodes immuno-chimiques (par ex : immuno-empreinte SAF) et est congelée si l'examen n'est pas réalisé immédiatement. Après prélèvement de la région de l'obex pour fixation et prélèvement de tissus frais, la plus grande partie du cerveau est conservé intact dans environ 4 à 6 l de fixateur à 10 %, qui doit être changé 2 fois par semaine. Après fixation pendant 2 semaines, le cerveau est découpé en tranches. Le temps de fixation peut être raccourci en coupant le tronc cérébral encore frais (après séparation du reste du cerveau) en petites sections coronales, comme la région de l'obex enlevé initialement, mais en laissant intact les zones importantes pour le diagnostic aux niveaux des pédoncules cérébelleux et des collicules rostraux (Fig. 1a et 1b, respectivement les niveaux B–B et C–C). En fonction d'autres facteurs (température, agitation, épaisseur des blocs de tissu, utilisation du

micro-onde) le temps de fixation de ces petites pièces du tronc cérébral peut être réduit à 2-5 jours. Cependant, l'évaluation des effets de ce type de préparation sur les protocoles d'IHC doit satisfaire aux normes régissant les programmes de contrôle des compétences des laboratoires (« *proficiency testing* »). Les autres parties du cerveau fixées au formol peuvent être utilisées pour les diagnostics différentiels après avoir été fixées durant 2 semaines comme recommandé par les normes en la matière.

Quand des cas d'ESB dans un pays donné ont été établis dans la population bovine indigène, et qu'il a été montré que la distribution des lésions et d'autres aspects phénotypiques sont cohérents avec ceux vus dans les cerveaux des bovins issus de l'épizootie du Royaume-Uni, il est adéquat à des fins de contrôle, bien que ce ne soit pas l'idéal, de prélever le tronc cérébral seul.

Ceci peut être réalisé via le trou occipital sans retrait du calvarium (Fig. 2). Ceci réduira la quantité de fixateur requise, le délai de fixation et le matériel nécessaire ; cela diminuera les coûts et améliorera la sécurité, tout en maintenant la représentation des aires-cibles majeures pour l'examen histologique. Cette méthode permet de collecter et d'examiner un grand nombre d'échantillons lors de surveillance passive ou d'un programme de surveillance active dans les abattoirs. Le tronc cérébral est disséqué à travers le trou occipital grâce à un instrument en forme de cuillère aux bords tranchants et sans ouverture du crâne (Fig. 2). De tels instruments en plastic ou en métal sont disponibles dans le commerce. Il est possible que des différences dans les techniques existent, en particulier quant à l'axe d'orientation, selon les formes des instruments ; ce qui souligne le besoin de formation des techniciens une fois le choix de l'instrument effectué. Dans les abattoirs, il est aussi possible de retirer l'intégralité du tronc cérébral par le trou occipital en appliquant une forte pression avec de l'eau ou de l'air (20) en passant par le trou réalisé à l'aide d'un appareil étourdissant et perforateur au moment de l'abattage, ce qui permet d'obtenir du matériel de bonne qualité pour l'histologie. Il est évident que la faisabilité et l'efficacité de cette méthode dépendra de la méthode d'abattage et devra faire l'objet d'une analyse de risque avant mise en œuvre en routine.

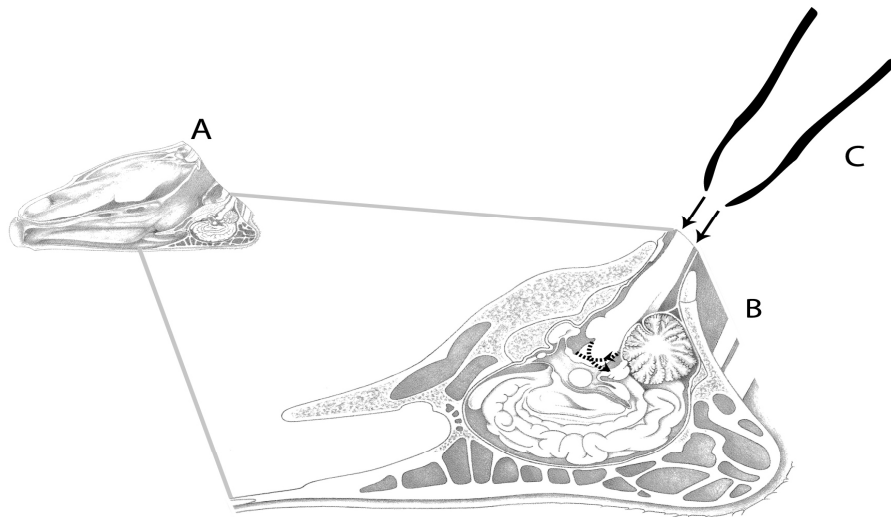


Fig. 2. Une fois que la tête a été séparée du corps par section entre l'atlas et les condyles occipitaux, elle est placée sur un support, face ventrale vers le haut (A), la portion caudale du tronc cérébral (moelle allongée) apparaissant à travers le trou occipital (voir B, schéma agrandi du crâne). L'instrument (C) est inséré par le trou occipital entre la dure-mère et les faces ventrale ou dorsale (selon l'approche choisie) de la moelle et pousser vers l'avant en gardant la partie convexe de la cuillère appliquée sur l'os du crâne, et par des mouvements rotatifs latéraux. Cela a pour but de sectionner les nerfs crâniens sans endommager le tissu cérébral. L'instrument est poussé vers l'avant sur environ 7 cm, puis on lui imprime un angle aigu (c.-à-d. vers la face dorsale ou ventrale du tronc cérébral en fonction de l'approche choisie) afin de couper et de séparer le tronc cérébral (avec des fragments du cervelet) du reste du cerveau. En conservant l'angle donné à l'instrument celui-ci est retiré du crâne pour enlever le tissu cérébral à travers le trou occipital.

Lorsqu'un cas est identifié par la surveillance active, les aires du cerveau nécessaires pour une caractérisation phénotypique complète ne seront vraisemblablement disponibles. Dans la plupart des pays, le tronc cérébral seul est collecté, même avant la première confirmation d'ESB. Idéalement, des dispositions devraient être prises pour que les têtes qui ont été prélevées au cours de la surveillance active soient conservées jusqu'à ce que les résultats des épreuves initiales soient disponibles. Ceci permettrait un prélèvement beaucoup plus complet du cerveau des animaux positifs et permettrait cette approche recommandée de la caractérisation des cas. Ceci est particulièrement important si des épreuves non validées sont utilisées, et quand en l'absence de comparaison directe avec des méthodes décrites ici, des identifications de nouveaux phénotypes sont prétendument réalisées. Lorsqu'une méthode immunologique rapide est utilisée de manière principale pour la surveillance dans un pays où aucun diagnostic d'ESB n'a été réalisé, il est important de conserver des échantillons supplémentaires pour des tests complémentaires (morphologique ou par IHC) qui permettront la caractérisation du phénotype de la maladie.

- **Prélèvement du tronc cérébral lors de surveillance active avec utilisation de tests rapides**

Le prélèvement et le traitement des tissus cérébraux à destination d'une épreuve rapide doit être réalisé précisément tel qu'il est spécifié par le fournisseur ou le fabricant de la méthode de diagnostic ou du kit de diagnostic. Les détails de cette procédure varient d'une méthode à l'autre et ne doivent pas être modifiés sans le soutien de données de validation par le fabricant pour la nouvelle méthode. L'échantillon privilégié pour l'épreuve immunologique est situé au niveau de l'obex, ou à moins de 1 cm en avant (ou en arrière) de l'obex, du fait de l'extension vers l'avant et l'arrière des sites ciblés (Fig. 3) pour mise en évidence des accumulations de la PrP^{Sc} et l'évaluation de l'échantillon par des tests rapides. Le choix du site-cible doit prendre en compte la méthode de confirmation retenue. Au moins une hémisection de la moelle au niveau de l'obex devra être fixée pour l'immunohistochimie et l'histologie. Un prélèvement en avant ou en arrière de l'obex pour un test rapide ne compromet pas l'examen par des techniques histologiques ou IHC. Cependant, afin d'obtenir des échantillons comparables pour des tests rapides et des techniques de confirmation, il est préférable de pratiquer les prélèvements de la moelle par hémisections au niveau de l'obex. Même si cette méthode entraîne la perte de la capacité à apprécier la symétrie des lésions, cette approche compromettra vraisemblablement moins le plus important examen à savoir l'IHC. Néanmoins, si cette approche est adoptée, il devient critique de s'assurer que les sites-cibles ne sont pas compromis. Par exemple, à la fois le noyau du tractus solitaire et le noyau dorsal moteur du nerf vague (l'aire-cible chez les bovins atteints d'ESB) sont petits et s'étendent à proximité de la ligne médiane (Fig. 3). Si les tissus prélevés sont autolysés au point que l'orientation anatomique n'est plus possible, une fraction aliquote non identifiée peut être récupérée et testée. Un résultat positif reste valable mais un résultat négatif ne permet pas de conclure que l'animal n'était pas atteint, et l'interprétation des résultats devra être faite avec prudence et les conclusions rapportées avec les explications appropriées.

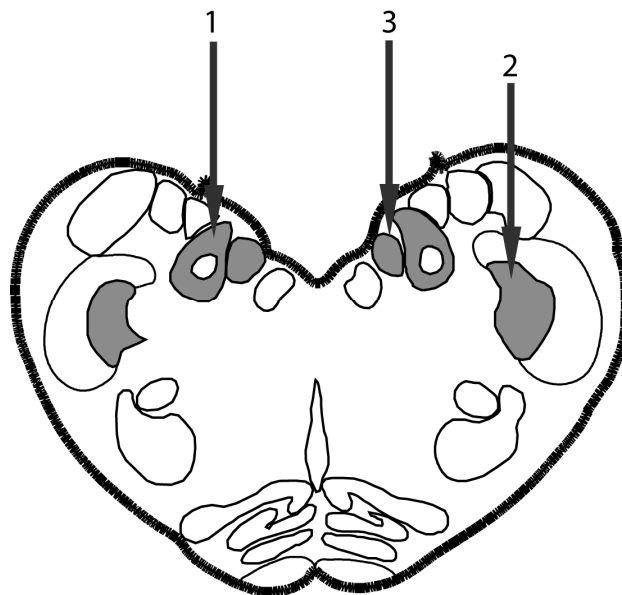


Fig. 3. Section transversale du tronc cérébral d'un bovin au niveau de l'obex identifiant les site-cibles clés pour le diagnostic par histopathologie et immunohistochimie dans le cas de l'ESB. Il s'agit principalement du noyau du tractus solitaire [1] et du noyau spinal du tractus du nerf trijumeau [2], mais aussi du noyau dorsal du nerf vague [3]. Il s'en suit que le matériel prélevé en vue d'un test rapide doit comprendre des fractions de ces régions.

Une hémisection inexacte pourrait facilement résulter en la perte complète d'une aire-cible pour les épreuves de confirmation et réduire significativement l'efficacité des programmes de surveillance. De même, une erreur dans l'échantillonnage des aires-cibles peut survenir lors d'une mauvaise position des instruments de prélèvements. Une telle approche nécessite d'être instaurée avec un plan d'action très clair et un programme de suivi pour la formation et une assurance qualité des procédures d'échantillonnage. Du fait de la distribution inégale de la PrP^{Sc}, la taille et la localisation de l'échantillon doivent être celle décrites dans le kit de diagnostic, ou si ce n'est pas spécifié, la taille doit être d'au moins 0,5 g prélevés dans l'aire cible pour tous les tests de confirmation comme cela est décrit dans la Figure 3. Les caractéristiques de performance de certaines épreuves peuvent être compromises par les changements autolytiques, notamment du fait qu'il n'est pas possible d'inclure dans le prélèvement l'aire-cible détaillée dans la Figure 3.

b) Examens diagnostiques

i) Examen histologique

L'histopathologie n'est plus la méthode de diagnostic de choix pour la détection des animaux suspects ou pour le dépistage au sein de populations saines. Cependant, la connaissance des changements histopathologiques est importante pour faciliter la détection des cas quand on conduit des diagnostics de routine à base d'examens histologiques de cerveaux de bovins sains. Pour le diagnostic différentiel, des coupes au niveau médulla-obex d'une épaisseur de 5 µm sont colorées à l'hématoxyline-éosine. Si les tissus sont de bonne qualité, l'examen histopathologique de coupes colorées à l'hématoxyline-éosine permet également une confirmation des lésions neuropathologiques caractéristiques de l'ESB (30, 36) qui ont été à la base du premier diagnostic d'encéphalopathie spongiforme. Les changements histopathologiques comprennent essentiellement de nombreux changements spongiformes et une vacuolisation neuronale et ressemblent étroitement à ceux de toutes les autres EST animales, mais dans le cas de l'ESB, la fréquence élevée d'apparition de la vacuolisation neuroparenchymateuse dans certains noyaux anatomiques de la moelle allongée au niveau de l'obex fournit un moyen satisfaisant d'établir un diagnostic histopathologique sur une section unique de moelle (34) dans les cas suspects de maladie. Comme pour les autres espèces, les changements vacuolaires dans le cerveau des bovins, notamment des vacuoles dans le péricaryon des noyaux rouges et oculomoteurs du mésencéphale sont des trouvailles occasionnelles (18). Le diagnostic histopathologique de l'ESB ne doit pas, par conséquent, se baser sur la seule présence de neurones vacuolisés notamment dans ces localisations anatomiques.

Le diagnostic peut être confirmé si des changements morphologiques typiques sont présents dans la moelle au niveau de l'obex, mais sans tenir compte du diagnostic histopathologique, l'immunohistochimie est maintenant aussi employée en routine ; une observation non publiée suggère qu'au moins 5 % des cas cliniques suspects (négatifs sur des coupes colorées à l'hématoxyline-éosine pour recherche de changements vacuolaires dans l'obex) peuvent être détectés par examen en IHC. Il est évident que cette méthode limitée à l'examen de la moelle-obex ne permet ni un diagnostic différentiel ni une caractérisation phénotypique d'une quelconque EST. C'est pourquoi il est recommandé de retirer le cerveau en entier de tous les cas cliniques suspects.

ii) Détection des formes de PrP spécifiques de la maladie

L'utilisation généralisée des méthodes de détection de la PrP fournit de nos jours des moyens de diagnostic spécifique indépendants des changements morphologiques définis par l'approche histopathologique. Par conséquent beaucoup de laboratoires ont, à présent, complété ou remplacé l'examen histopathologique par l'IHC ou d'autres méthodes de détection de la PrP. La détection des accumulations de la PrP^{Sc} est la méthode de choix pour les programmes de surveillance et les diagnostics de confirmation. Il est possible (mais pas souhaitable) de pratiquer l'immunohistochimie pour la recherche de la PrP sur du matériel qui a été congelé avant la fixation (12). La congélation avant fixation ne compromettra pas la réactivité immunologique du prélèvement mais elle risque de compromettre l'identification des sites cibles qui doit être vérifiée avant de déclarer un résultat négatif.

• Méthodes immunohistochimiques

La technique IHC pour rechercher la PrP^{Sc} est appliquée sur des coupes obtenues à partir du même matériel (moelle au niveau de l'obex) fixé au formol et inclus dans de la paraffine que celui utilisé pour le diagnostic histopathologique (36). Plusieurs protocoles ont été employés avec succès pour la détection de la PrP^{Sc} dans le diagnostic de l'ESB. Bien qu'une harmonisation pour définir une méthode d'IHC normalisée et validée pour le diagnostic de routine soit souhaitable, l'expérience a montré qu'il est plus important de reconnaître des méthodes robustes donnant des résultats normalisés, dans le cadre de programme de contrôle des compétences des laboratoires (« *proficiency testing* »), par comparaison avec les résultats d'une méthode de référence normalisée d'un Laboratoire de référence.

La technique ne requiert pas nécessairement une longue fixation du tissu, bien que pour précision, les directives établies pour l'histopathologie sont toujours valables et le tissu fourni peut être adéquatement traité histologiquement, cela fonctionne bien sur des tissus autolysés dans lesquels l'évaluation morphologique n'est plus possible (11, 25). Cependant, il reste nécessaire de pouvoir reconnaître l'anatomie

de l'échantillon afin de savoir si oui ou non les zones cibles sont représentées. Cela est indispensable lors d'un diagnostic négatif et peut aussi se révéler important lors d'une interprétation d'un marquage immunologique douteux. La détection IHC des accumulations de PrP^{Sc} est d'une sensibilité proche de celle de la méthode de Western blot pour la détection de la PrP^{Sc} (28). Associée à de bonnes préparations histologiques, l'IHC permet la détection des accumulations de PrP^{Sc} et, comme les lésions vacuolaires, déploie une apparence et un motif de distribution typique, elle fournit une évaluation simultanée ou une confirmation du phénotype de la maladie. Les méthodes actuelles sont disponibles auprès des Laboratoires de référence de l'OIE (15, 42).

Contrairement à ce qui se passe dans le diagnostic de la tremblante du mouton, la détection limitée de la PrP^{Sc} dans les tissus lymphoïdes lors d'ESB ne présente pas d'avenir quant à l'utilisation de ces tissus pour le diagnostic pré-clinique après biopsies.

- **Méthodes de Western blot**

Les techniques d'immuno-empreintes sont réalisées sur des tissus frais non fixés et peuvent être utilisées avec succès quand les tissus sont autolysés (19). La méthode immuno-empreinte/SAF (15) a été la première utilisée pour le diagnostic de l'ESB. Elle a une sensibilité diagnostique semblable à celle des techniques de l'IHC ; elle reste la méthode de choix avec l'immunohistochimie pour la confirmation ou l'infirmerie d'une suspicion d'ESB. Au cours de la dernière décennie, d'autres méthodes ont été développées qui prennent moins de temps et sont moins coûteuses. La plupart de ces techniques sont basées une précipitation de la PrP^{Sc} à l'aide de l'acide phosphotungstique ou d'autres produits chimiques (31), et certaines sont disponibles dans le commerce.

Bien que la méthodologie Western blot soit actuellement très largement employée, sa sensibilité analytique quand elle est utilisée pour détecter la PrP^{Sc} varie de façon non négligeable selon les techniques et les laboratoires. Quand des techniques développées au laboratoire sont préférées aux techniques publiées, il importe qu'elles soient évaluées quant à leur adaptation pour l'objectif et validées en relation avec un Laboratoire de référence de l'OIE.

- **Méthodes rapides**

Des techniques de Western blot automatisé et immuno-enzymatiques (ELISA) ont été développées qui permettent le criblage d'un très grand nombre d'échantillons de cerveaux et sont maintenant disponibles commercialement. De telles techniques peuvent être réalisées en quelques heures (voir les évaluations de la Commission Européenne sur les tests rapides pour la détection de l'ESB sur des échantillons positifs et négatifs en IHC [14]).

Alors que de nombreux pays, ainsi que le Groupe *ad hoc* de l'OIE sur les tests pour l'ESB, ont accepté l'accréditation de l'UE comme un indicateur des performances des tests, d'autres ont établi leur propre schéma d'homologation, notamment les États-Unis d'Amérique, le Canada et le Japon (14, 26). Actuellement, l'OIE a aussi élaboré une procédure d'homologation avec un schéma propre d'évaluation qui est disponible sur le site internet de l'OIE (43). La méthode d'évaluation de l'UE pour l'homologation a été acceptée comme « *gold standard* » pour les futures évaluations en termes de niveaux de sensibilité et de spécificité acceptables.

Les sensibilités relatives des tests rapides, de l'immunohistochimie et des autres méthodes de confirmation doivent encore être déterminées. Ces données sont particulièrement importantes pour l'évaluation des tests rapides quand ils sont utilisés sur des animaux ne présentant pas de signes cliniques d'ESB. Des évaluations menées dans l'UE étaient restreintes à une comparaison de l'examen d'un échantillon de cerveaux de bovins identifiés comme des animaux cliniquement suspects présentant des changements histopathologiques caractéristiques de l'ESB et un échantillon de cerveaux de bovins histopathologiquement négatifs. Les tests rapides sont utilisés pour le dépistage initial d'animaux au cours des tous derniers mois de la période d'incubation, par exemple dans les enquêtes sur du matériel *post mortem* collectés sur des bovins abattus en routine. Dans les pays conduisant une surveillance afin de détecter l'apparition nouvelle d'ESB et dans ceux pour lesquels un moyen, indépendant du système de notification des cas suspects, pour établir la prévalence de l'ESB est considéré comme nécessaire, ces tests de dépistage offrent une approche efficace. Depuis leur introduction pour le dépistage actif en Europe depuis Janvier 2001, de telles épreuves ont été responsables de l'identification de la majorité des animaux infectés par l'ESB. Dans certains pays, étant donné la vitesse avec laquelle le résultat peut être obtenu, les épreuves rapides sont les épreuves privilégiées de première intention, mais la confirmation du diagnostic de l'ESB requiert l'examen de cerveau fixé par histopathologie et/ou IHC ou une technique Western blot appropriée. Toutefois, en 2006, l'OIE a constaté qu'au cours de leur utilisation dans les programmes de dépistage rapide, ces tests rapides commercialisés se sont révélés très efficaces et fiables à la condition qu'ils soient réalisés par des personnels correctement entraînés. En effet, ils peuvent à l'occasion être moins performants que les épreuves de référence pour la comparaison si ceux-ci sont réalisés par du personnel dont la formation et l'expérience sont insuffisantes. Dans de telles circonstances et même si ce n'est pas l'idéal, il est maintenant accepté que les tests rapides soient utilisés en association avec d'autres méthodes aussi bien pour le

dépistage actif que pour le dépistage passif et, par conséquent, pour la confirmation. Il est néanmoins indispensable de s'assurer que le choix des tests primaires et secondaires sont bien compatibles, et ne présentent pas de risque de donner des résultats faussement positifs. Un algorithme des combinaisons appropriées des tests sera donc consultables sur le web site du VLA afin d'aider ceux qui désirent suivre cette approche plutôt que celles de l'histopathologie, l'immunohistochimie ou la technique Western blot/SAF pour la confirmation (15). Le VLA ne changera pas son site web sans en informer l'OIE. Les associations idéales devraient comprendre une épreuve ELISA et une méthode Western blot car elles donnent généralement des résultats complémentaires utiles pour la caractérisation phénotypique de l'échantillon en l'absence d'un examen de tissus fixés.

Dans certaines circonstances, un test rapide approuvé par l'UE ou l'OIE pourra être utilisé pour confirmer un cas d'ESB chez des bovins après un résultat initial positif avec un test rapide approuvé. Cette approbation dépend d'un examen des réactifs utilisés dans chacun des tests rapides pour s'assurer que les deux tests sont bien compatibles. Basée sur des données confidentielles fournies par les fabricants, une procédure est maintenant disponible que l'on peut résumer comme suit :

1. La confirmation doit toujours être effectuée dans un Laboratoire national de référence (LNR) pour les EST.
2. Le deuxième test doit comprendre un témoin négatif et un échantillon d'ESB comme témoin positif.
3. Le deuxième test doit être différent du premier (autrement dit deux résultats positifs avec le même test n'apportent pas une confirmation suffisante).
4. Si un test Western blot rapide est utilisé comme premier test, le résultat doit être documenté et soumis au LNR.
5. Une des deux méthodes doit être un western blot.

Seule une association de deux tests rapides peut être utilisée pour la confirmation d'un cas d'ESB. Un résultat négatif avec un deuxième test après un premier résultat positif est insuffisant pour considérer un cas comme négatif. Les cas suspects d'ESB donnant des résultats discordants avec des tests rapides doivent être examinés de façon approfondie à l'aide d'une technique d'immuno-empreinte-SAF (ou d'une autre méthode agréée) ou par mise en évidence de la PrP^{Sc} par ICH, ou si ces méthodes ne sont pas disponibles, par histopathologie. Si l'histopathologie ne peut pas confirmer le résultat positif initial, des échantillons doivent être soumis au Laboratoire de référence de l'OIE pour une recherche complémentaire.

Bien que les programmes d'évaluation des tests menés en Europe confortent la législation européenne sur la surveillance de l'ESB, les conséquences intéressent également d'autres pays. Les conséquences de résultats faux-positifs ou faux-négatifs sont si grandes que l'introduction de nouvelles épreuves doit être cautionnée par une évaluation exhaustive de la performance des tests. Les prétentions des tests produits par les fabricants doivent toujours être supportées par des données, idéalement évaluées indépendamment. Il doit être souligné que le processus complet de validation de toutes ces méthodes de diagnostic de l'ESB a été restreint par le manque d'un véritable « *gold standard* » et la nécessité qui s'en suit d'appliquer des épreuves de référence pour la comparaison dont l'évaluation des performances n'a été basée sur de relativement petites études. Il y a donc un besoin constant de publications d'études à plus large échelle de la performance des tests, et aucune des données publiées jusqu'ici ne réalise une comparaison avec les procédures de validation des tests qui sont reconnues pour les autres maladies.

d) Autres épreuves de diagnostic

La démonstration des fibrilles caractéristiques, l'homologue bovin des SAF (voir Chapitre 2.7.13., « Tremblante »), par microscopie électronique à coloration négative dans des tissus cérébraux ou de moelle épinière, frais ou congelés, extraits par des détergents (32), a été utilisée comme une méthode de diagnostic additionnelle pour l'ESB et s'est révélée particulièrement utile quand les approches histopathologiques étaient empêchées suite à une décomposition *post mortem*. Avec des modifications, la méthode pourrait être appliquée avec succès sur des tissus fixés au formol (9). La détection des fibrilles a été montrée comme corrélant bien avec le diagnostic histopathologique de l'ESB, mais elle n'offre pas la spécificité ou la sensibilité disponible par les méthodes IHC ou d'immuno-empreinte. L'infection de l'ESB peut être mise en évidence en inoculant (par voie intracérébrale ou intrapéritonéale) ou en nourrissant des souris avec des tissus cérébraux provenant de bovins atteints au stade terminal de la maladie, mais le bio-essai est peu réaliste en diagnostic de routine à cause de la longue période d'incubation. Des souris transgéniques, comme celles qui surexpriment le gène de la PrP bovine, conviennent pour des bio-essais car elles ont des périodes d'incubation réduites pour l'ESB, mais elles ne constituent pas encore un outil pratique de diagnostic.

Ainsi donc le besoin demeure d'une épreuve pour l'ESB qui puisse être appliquée sur l'animal vivant et qui ait une sensibilité capable de détecter la PrP^{Sc} à de faibles taux, tel que cela peut apparaître au cours de la période d'incubation de la maladie. Toutefois, l'efficacité d'autres approches potentielles n'a pas été démontrée. La Commission Européenne reste impliquée dans l'évaluation des tests *in vivo* et établit des

protocoles pour l'évaluation de tels tests (16). La détection de certains marqueurs de protéines d'une dégénérescence neuronale, comprenant l'apolipoprotéine E (Apo E), la protéine 14-3-3 et les protéines S-100 dans le liquide cébrospinal ne s'est pas révélée utile pour le diagnostic des cas précliniques d'ESB. La présence dans l'urine des hamsters infectés par la tremblante, de chaînes légères des IgG (22, 29) pourrait se révéler un marqueur d'une infection à prion et être une méthode diagnostique potentielle mais elle n'a pas fait l'objet de recherche pour le diagnostic de l'ESB jusqu'à présent.

2. Épreuves sérologiques

Les prions ne peuvent pas être cultivés *in vitro* et n'induisent pas une réponse immune significative chez l'hôte.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Aucun vaccin ni aucun produit biologique ne sont disponibles actuellement. Comme cela a été discuté précédemment, des kits de diagnostic ont été accrédités dans de nombreux pays.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANDERSON R.M., DONNELLY C.A., FERGUSON N.M., WOOLHOUSE M.E.J., WATT C.J., UDY H.J., MAWHINNEY S., DUNSTAN S.P., SOUTHWOOD T.R.E., WILESMITH J.W., RYAN J.B.M., HOINVILLE L.J., HILLERTON J.E., AUSTIN A.R. & WELLS G.A.H. (1996). Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*, **382**, 779–788.
2. BARON T.G.M., BIACABE A.G., BENCSIK A. & LANGEVELD J.P.M. (2006). Transmission of new bovine prion to mice. *Emerging Infect. Dis.*, **12**, 1125–1128.
3. BIACABE A.G., LAPLANCHE J.L., RYDER S. & BARON T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Reports*, **5**, 110–114.
4. BRUCE M.E. (1996). Strain typing studies of scrapie and BSE. *In: Methods in Molecular Medicine: Prion Diseases*, Baker H. & Ridley R.M., eds. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 223–236.
5. BUSCHMANN A., GRETZSCHEL A., BIACABE A.G., CORONA C., HOFFMANN C., EIDEN M., BARON T., CARAMELLI M., CONRATHS F.J. & GROSCHUP M.H. (2006). Atypical BSE cases in Germany. *Vet. Microbiol.*, **117**, 103–116.
6. BRUCE M.E., WILL R.G., IRONSIDE J.W., MCCONNELL I., DRUMMOND D., SUTTIE A., MCCARDLE L., CHREE A., HOPE J., BIRKETT C., COUSENS S., FRASER H. & BOSTOCK C.J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, **389**, 498–501.
7. CASALONE C., CARAMELLI M., CRESCIO M.I., SPENCER Y.I. & SIMMONS M.M. (2006). BSE immunohistochemical patterns in the brainstem: a comparison between UK and Italian cases. *Acta Neuropathol.*, **111**, 444–449.
8. CASALONE C., ZANUSO G., ACUTIS P., FERRARI S., CAPUCCI L., TAGLIAVINI F., MONACO S. & CARAMELLI M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Cruetzfeldt-Jacob disease. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 3065–3670.
9. CHAPLIN M.J., ALDRICH A.D & STACK M.J (1998). Scrapie associated fibril detection from formaldehyde fixed brain tissue in natural cases of ovine scrapie. *Res. Vet. Sci.*, **64**, 41–44.
10. COLLINGE J., SIDLE K.C.L., MEADS J., IRONSIDE J. & HILL A.F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, **383**, 685–690.
11. DEBEER S.O.S., BARON T.G.M. & BENCSIK A.A. (2001). Immunohistochemistry of PrP^{Sc} within bovine spongiform encephalopathy brain samples with graded autolysis. *J. Histochem. Cytochem.*, **49**, 1519–1524.
12. DEBEER S.O.S., BARON T.G.M. & BENCSIK A.A. (2002). Transmissible spongiform encephalopathy diagnosis using PrP immunohistochemistry on fixed but previously frozen brain samples. *J. Histochem. Cytochem.*, **50**, 611–616.

13. EUROPEAN COMMISSION (EC). Outcomes of discussions of the Scientific Steering Committee (1998–2003). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html
14. EUROPEAN COMMISSION (EC). TSE Community Reference Laboratory – Test Evaluation and approval. <http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-tse-rl-tests.htm>
15. EUROPEAN COMMISSION (EC). TSE Community Reference Laboratory – Web Resources. <http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-tse-rl-web.htm>
16. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinions of the Scientific Panel on Biological Hazards. http://www.efsa.europa.eu/en/science/biohaz/biohaz_opinions.html
17. GAVIER-WIDEN D., STACK M.J., BARON T., BALACHANDRAN A. & SIMMONS M. (2005). Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 509–527.
18. GAVIER-WIDEN D., WELLS G.A.H., SIMMONS M.M., WILESMITH J.W. & RYAN J.B.M. (2001). Histological observations on the brains of symptomless 7-year-old cattle. *J. Comp. Path.*, **124**, 52–59.
19. HAYASHI H., TAKATA M., IWAMARU Y., USHIKI Y., KIMURA K.M., TAGAWA Y., SHINAGAWA M. & YOKOYAMA T. (2004). Effect of tissue deterioration on postmortem BSE diagnosis by immunobiochemical detection of an abnormal isoform of prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 515–520.
20. HEJAZI R. & DANYLUK A.J. (2005). Brainstem removal using compressed air for subsequent bovine spongiform encephalopathy testing. *Can. Vet. J.*, **46**, 436–437.
21. JACOB J.G., LANGEVELD J.P.M., BIACABE A.-G., ACUTIS P.-L., POLAK M.P., GAVIER-WIDEN D., BUSCHMANN A., CARAMELLI M., CASALONE C., MAZZA M., GROSCUP M., ERKENS J.H.F., DAVIDSE A., VAN ZIJDERVELD F.G. & BARON T. (2007). Molecular discrimination of atypical Bovine Spongiform Encephalopathy strains in a geographical region spanning a wide area in Europe. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 1821–1829.
22. KARIV-INBAL Z., BEN-HUR T., GRIGORIADIS N.C., ENGELSTEIN R. & GABIZON R. (2006). Urine from scrapie-infected hamsters comprises low levels of prion infectivity. *Neurodegener. Dis.*, **3**, 123–128.
23. KIRKWOOD J.K. & CUNNINGHAM A.A. (2006). Portrait of Prion Diseases in Zoo Animals. In: Prions in Humans and Animals. Hörnlimann B., Riesner D. & Kretzschmar H. eds. De Gruyter, Berlin, Chapter 20, 250–256.
24. KONOLD T., BONE G., RYDER S., HAWKINS S.A., COURTIN F., BERTHELIN-BAKER C. (2004). Clinical findings in 78 suspected cases of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain. *Vet. Rec.*, **155**, 659–666.
25. MONLEON E., MONZON M., HORTELLS P., VARGAS A., BADIOLA J.J. (2003). Detection of PrP^{Sc} in samples presenting a very advanced degree of autolysis (BSE liquid state) by immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **51**, 15–18.
26. National Veterinary Assay Laboratory. Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. Outline of Regulation System of Veterinary Drugs in Japan. <http://www.nval.go.jp/info/outline060728.pdf>
27. PRINCE M.J., BAILEY J.A., BARROWMAN P.R., BISHOP K.J., CAMPBELL G.R. & WOOD J.M. (2003). Bovine spongiform encephalopathy. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **22**, 37–60 (English); 61–82 (French); 83–102 (Spanish).
28. SCHALLER O., FATZER R., STACK M., CLARK J., COOLEY W., BIFFIGER K., EGLI S., DOHERR M., VANDEVELDE 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.
29. SERBAN A., LEGNAME G., HANSEN K., KOVALEVA N. & PRUSINER S.B. (2004). Immunoglobulins in urine of hamsters with scrapie. *J. Biol. Chem.*, **279**, 48817–48820.
30. SIMMONS M.M., HARRIS P., JEFFREY M., MEEK S.C., BLAMIRE I.W.H. & WELLS G.A.H. (1996). BSE in Great Britain: consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. *Vet. Rec.*, **138**, 175–177.
31. STACK M.J. (2004) Western immunoblotting techniques for the study of transmissible spongiform encephalopathies. In: Methods and Tools in Biosciences and Medicine – Techniques in Prion Research, Lehmann S. & Grassi J., eds. Birkhäuser Verlag, Berlin, Germany, 97–116.

32. STACK M.J., KEYES P. & SCOTT A.C. (1996). The diagnosis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie by the detection of fibrils and the abnormal protein isoform. *In: Methods in Molecular Medicine: Prion Diseases*, Baker H. & Ridley R.M., eds. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 85–103.
33. TAYLOR D.M. (2000). Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review. *Vet. J.*, **159**, 10–17.
34. WELLS G.A.H., HANCOCK R.D., COOLEY W.A., RICHARDS M.S., HIGGINS R.J. & DAVID G.P. (1989). Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *Vet. Rec.*, **125**, 521–524.
35. WELLS G.A.H. & HAWKINS S.A.C. (2004). Animal models of transmissible spongiform encephalopathies: experimental infection, observation and tissue collection. *In: Techniques in Prion Research*. Lehmann S. & Grassi J., eds. Birkhäuser Verlag, Switzerland, 37–71.
36. WELLS G.A.H. & WILESMITH J.W. (1995). The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol.*, **5**, 91–103.
37. WELLS, G.A.H. & WILESMITH, J.W. (2004). Bovine spongiform encephalopathy and related diseases. *In: Prion Biology and Diseases*, Second Edition. Prusiner S., ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 595–628.
38. WILESMITH J.W., HOINVILLE L.J., RYAN J.B.M. & SAYERS A.R. (1992). Bovine spongiform encephalopathy: aspects of the clinical picture and analyses of possible changes 1986–1990. *Vet. Rec.*, **130**, 197–201.
39. WILESMITH J.W., WELLS G.A.H., CRANWELL M.P. & RYAN J.B.M. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.*, **123**, 638–644.
40. WILL R.G., IRONSIDE J.W., ZEIDLER M., COUSENS S.N., ESTIBEIRO K., ALPEROVITCH A., POSER S., POCCHIARI M., HOFMAN A. & SMITH P.G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, **347**, 921–925.
41. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). World animal health situation – Bovine spongiform encephalopathy. http://www.oie.int/eng/info/en_esb.htm
42. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). OIE Expertise – Reference Laboratories. http://www.oie.int/eng/OIE/organisation/en_LR.htm
43. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). OIE: Validation and certification of Diagnostic Assays. http://www.oie.int/vcda/eng/en_background_vcda.htm
44. YAMAKAWA Y., HAGIWARA K., NOHTOMI K., NAKAMURA Y., NISHIJIMA M., HIGUCHI Y., SATO Y., SATA T. & EXPERT COMMITTEE FOR BSE DIAGNOSIS (2003). Atypical proteinase K-resistant prion protein (PrPres) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein steer. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **56**, 221–222.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour l'Encéphalopathie spongiforme bovine (se reporter à la liste dans la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).

TUBERCULOSE BOVINE

RÉSUMÉ

La tuberculose bovine est une maladie bactérienne chronique des animaux et de l'homme causée par Mycobacterium bovis. Dans un grand nombre de pays la tuberculose bovine est une maladie infectieuse majeure parmi les bovins, d'autres animaux domestiques, et parmi certaines populations sauvages. La transmission à l'homme constitue un problème de santé publique.

L'exposition aux aérosols de M. bovis est considérée être la voie la plus fréquente de l'infection des bovins, mais l'infection par ingestion de matériels contaminés se rencontre aussi. Après infection, un granulome nodulaire non vascularisé connu comme « tubercule » peut se développer. Les lésions tuberculeuses caractéristiques se rencontrent le plus fréquemment dans les poumons et les nœuds lymphatiques rétropharyngiens, bronchiques et médiastinaux. Des lésions peuvent aussi être trouvées dans les nœuds lymphatiques mésentériques, le foie, la rate, sur les membranes séreuses, et dans les autres organes.

L'infection de la tuberculose bovine chez les bovins est habituellement diagnostiquée chez l'animal vivant sur la base des réactions de l'hypersensibilité retardée. L'infection est souvent subclinique ; quand elle est présente, les signes cliniques ne sont pas spécifiquement distinctifs de la maladie et peuvent englober de la faiblesse, de l'anorexie, une émaciation, de la dyspnée, une hypertrophie des nœuds lymphatiques, et de la toux, particulièrement dans la tuberculose avancée. Après la mort, l'infection est diagnostiquée par examen post mortem et par des méthodes histopathologiques et bactériologiques. Les techniques rapides basées sur l'acide nucléique telles que l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) peuvent aussi être utilisées. Celles-ci réclament des qualités techniques et seules les procédures validées doivent être utilisées. La culture mycobactérienne traditionnelle reste la méthode de routine pour confirmer l'infection.

Identification de l'agent pathogène : *les examens bactériologiques peuvent comprendre la démonstration des bacilles acido-résistants par examen microscopique (ce qui apporte la confirmation d'une présomption), l'isolement des mycobactéries sur milieux de culture sélectifs et leur identification postérieure par des tests culturels et biochimiques ou des techniques basées sur l'acide nucléique. Il est rare, de nos jours, de recourir à l'inoculation à l'animal qui était utilisée auparavant pour confirmer les diagnostics, en raisons de considérations de bien-être animal.*

Épreuve d'hypersensibilité retardée : *cette épreuve est la méthode de référence pour la détection de la tuberculose bovine. Elle implique la mesure de l'épaisseur de la peau, l'injection intradermique de tuberculine bovine dans l'aire mesurée et la mesure de l'épaississement postérieur au point de l'injection 3 jours plus tard.*

La réaction tuberculinique intradermique comparative avec la tuberculine aviaire et la tuberculine bovine est utilisée principalement pour différencier les animaux infectés avec M. bovis de ceux sensibilisés à la tuberculine par une exposition à d'autres mycobactéries ou à un genre apparenté.

L'épreuve à utiliser dépend généralement de la prévalence de l'infection tuberculeuse et du niveau de l'exposition environnementale à d'autres organismes sensibilisants.

En raison de leur spécificité plus élevée et de leur normalisation plus facile, les produits dérivés protéiques purifiés (PPD) ont remplacé les tuberculines concentrées à chaud sur milieu synthétique. La dose recommandée de PPD bovine chez les bovins est au moins de 2 000 unités internationales (UI) et pour l'épreuve tuberculinique comparative, les doses ne doivent pas être inférieures à 2 000 UI chacune. Les réactions sont interprétées sur la base de schémas appropriés.

Épreuves sérologiques : des épreuves sérologiques de diagnostic sont maintenant disponibles, ex. le dosage de l'interféron-gamma, la prolifération des lymphocytes, et la méthode immuno-enzymatique (ELISA). La logistique et l'exécution au laboratoire de certaines de ces épreuves peuvent être un facteur limitant. L'utilisation d'épreuves basées sur le sang peut être avantageuse, surtout avec des bovins indociles, des animaux de zoo et des animaux sauvages, bien que l'interprétation de l'épreuve puisse être gênée par le manque de données pour certaines espèces.

Des informations sur l'utilisation des diverses techniques de diagnostic chez les animaux autres que les bovins sont disponibles dans une synthèse récente de Cousins et Florisson (9).

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : des vaccins sont développés et testés pour utilisation chez les bovins et la faune sauvage, mais à l'heure actuelle ils ne sont pas administrés en routine car ils risquent de compromettre l'usage de l'intradermo réaction à la tuberculine et des autres tests immunologiques. Pour la production des tuberculines PPD bovine, il existe des méthodes de référence. La PPD utilisée pour la réalisation des tests spécifiques doit être préparée en accord avec les exigences de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et doit se conformer à ces exigences en respectant la source des matériels, les méthodes et les précautions de production, l'addition des substances, l'absence de contamination, l'identité, la sécurité, l'activité, la spécificité et l'absence d'effet sensibilisant. Les essais biologiques pour l'activité biologique sont d'une importance particulière, et l'activité doit être exprimée en UI.

A. INTRODUCTION

Mycobacterium bovis est un organisme zoonotique et, pendant l'examen diagnostic, il doit être traité comme un organisme du groupe III risque/danger avec des précautions appropriées pour prévenir l'apparition d'infection chez les humains.

La tuberculose bovine est une maladie infectieuse causée par *M. bovis* et elle est habituellement caractérisée par la formation de granulomes nodulaires connus comme « tubercules ». Bien que communément définie comme une maladie débilitante chronique, la tuberculose bovine peut occasionnellement prendre un cours aigu rapidement progressif. N'importe quel tissu du corps peut être affecté, mais les lésions sont plus fréquemment observées dans les nœuds lymphatiques (particulièrement de la tête et du thorax), les poumons, les intestins, le foie, la rate, la plèvre et le péritoine.

Il convient de signaler que d'autres membres du complexe *M. tuberculosis*, auparavant considérés comme appartenant à l'espèce *M. bovis*, ont été élevés au rang de nouvelles espèces. Il s'agit de *M. caprae* (3) (accusé dans certains pays d'être un agent pathogène primaire pour les chèvres) et de *M. pinnipedii* (8), un agent pathogène des phoques et des lions de mer. En Europe centrale, *M. caprae* a été identifiée comme une cause fréquente de tuberculose bovine (36). Ces deux nouvelles espèces sont zoonotiques. La maladie due à *M. caprae* n'est pas considérée comme significativement différente de celle due à *M. bovis* et les mêmes techniques de diagnostic sont applicables.

Dans les pays qui ont un programme d'éradication de la tuberculose, la mise en évidence clinique de la tuberculose chez les bovins est rarement possible parce que le test intradermique de la tuberculine permet un diagnostic de présomption et l'élimination des animaux infectés avant que les signes n'apparaissent. Cependant, avant les campagnes nationales d'éradication de la tuberculose, les signes associés à la tuberculose étaient communément observés (7).

Ces signes varient avec la distribution des tubercules dans le corps mais, à quelques exceptions près, le cours de la maladie est chronique. Dans beaucoup d'exemples, les signes caractéristiques manquent, même dans les phases avancées de la maladie quand beaucoup d'organes peuvent être impliqués. L'implication des poumons peut être manifestée par une toux, qui peut être induite par des changements de température ou par une pression manuelle sur la trachée.

La dyspnée et les autres signes de pneumonie peu sévère sont aussi la preuve de l'implication des poumons. Dans les cas avancés, les nœuds lymphatiques sont souvent très hypertrophiés et peuvent obstruer le passage de l'air, le tractus alimentaire, ou les vaisseaux sanguins. L'atteinte des nœuds lymphatiques de la tête et du cou peut devenir visible et quelquefois on observe une rupture et un écoulement. L'implication du tractus digestif se manifeste par une diarrhée intermittente et, dans certains cas, par une constipation. L'extrême émaciation et la détresse respiratoire aiguë peuvent se rencontrer pendant les phases terminales de la tuberculose. Des lésions impliquant l'appareil génital femelle peuvent se présenter. L'appareil génital mâle est rarement atteint.

Les tubercules des bovins sont plus fréquemment observés à l'autopsie dans les nœuds lymphatiques bronchiques, médiastinaux, rétropharyngiens, et de la veine porte qui peuvent être les seuls tissus affectés. De plus, les poumons, le foie, la rate et les surfaces des cavités du corps sont communément affectés. D'autres sites anatomiques doivent être considérés comme ayant le potentiel de devenir infectés.

À l'autopsie, un granulome tuberculeux a habituellement une apparence jaunâtre et une consistance caséuse, caséo-calcaire, ou calcifiée. Occasionnellement, son apparence peut être purulente. Dans certains granulomes non tuberculeux, le contenu purulent avec un lustre verdâtre est remplacé par un tissu granuleux, qui peut avoir une ressemblance avec le granulome tuberculeux. Le centre caséux est habituellement sec, ferme, et recouvert d'une capsule fibreuse d'épaisseur variée. Les tissus attachés à un tubercule ne sont pas facilement enlevés intacts, comme c'est le cas avec certains granulomes non tuberculeux. La taille de la lésion varie d'assez petite (invisible à l'œil nu), à l'implication d'une part importante d'un organe. Plusieurs coupes d'organes et de tissus sont indispensables pour détecter les lésions contenues dans le tissu. Les lésions causées par *M. bovis* contiennent souvent peu de germes et l'absence d'organismes acido-résistants ne permet d'exclure la tuberculose dans les lymphadénies d'étiologie inconnue. Chez les cervidés et quelques espèces exotiques, la tuberculose devra être suspectée quand des abcès purulents et à paroi mince, sont observés en dehors de toute étiologie spécifique.

Mycobacterium bovis a été identifié dans la plupart des pays où les isolements de mycobactéries de patients humains ont été entièrement typés. L'incidence de la tuberculose pulmonaire causée par *M. bovis* est plus élevée chez les ouvriers dans les fermes et les abattoirs que chez les habitants des villes. La transmission de *M. bovis* aux humains via le lait et ses produits est bloquée par la pasteurisation du lait. Un des résultats des programmes d'éradication de la tuberculose bovine a été une réduction de la maladie et de la mort causées par la tuberculose bovine dans la population humaine.

Bien que les bovins soient considérés comme l'hôte véritable de *M. bovis*, la maladie a été signalée chez beaucoup d'animaux domestiques et sauvages. Des isolements ont été fait à partir de buffles, bisons, moutons, chèvres, équidés, chameaux, porcs, sangliers sauvages, cerfs, antilopes, chiens, chats, renards, visons, blaireaux, furets, rats, primates, lamas, koudous, élands, tapirs, wapiti, éléphants, sitatungas, oryx, addax, rhinocéros, opossums, écureuils, loutres, phoques, lièvres, taupes, ragondins, coyotes, et plusieurs félins prédateurs comprenant lions, tigres, léopards et lynx (12, 34).

La tuberculose bovine chez les animaux sauvages a d'abord été rapportée en 1929 chez le grand koudou (*Tragelaphus strepsiceros*) et le céphalophe de Grimm (*Sylvicapra grimmia*) en Afrique du sud. Durant les années 1940 les grands koudous dans la même région étaient trouvés infectés de manière enzootique. En 1982 en Ouganda, une prévalence de 10 % chez les buffles d'Afrique et de 9 % chez les phacochères (*Phacochoerus aethiopicus*) était trouvée. En Zambie, l'infection à *M. bovis* a été signalée chez les cobes lechwe de la Kafue (*Kobus leche kafuensis*) et chez un seul élan (*Taurotragus oryx*). Un foyer de tuberculose chez les babouins doguéra (*Papio cynocephalus anubis*) a été rapporté au Kenya. L'infection à *Mycobacterium bovis* a aussi été diagnostiquée chez les buffles d'Afrique dans le parc national Kruger en Afrique du sud (4), et plus récemment, elle a été également observée chez d'autres espèces telles que le babouin chacma (*Papio ursinus*), le lion (*Panthera leo*) et le guépard (*Acynonyx jubatus*) ainsi que chez le grand koudou.

L'application rigoureuse du test à la tuberculine et l'abattage des bovins réagissant a éliminé l'infection à *M. bovis* chez les bovins des fermes de certains pays, mais cette stratégie n'a pas été universellement couronnée de succès. Des investigations importantes sur la réapparition sporadique de *M. bovis* ont montré que des réservoirs sauvages existent dans certains pays qui peuvent se révéler une source de contamination pour les bovins, les cerfs et les autres bestiaux. La détection de l'infection dans une population d'animaux sauvages exige des recherches bactériologiques ou l'utilisation d'une méthode d'analyse valide pour les espèces impliquées (le test à la tuberculine n'est pas efficace chez toutes les espèces) associée à des analyses épidémiologiques informatisées. Il a été démontré que le blaireau (*Meles meles*) au Royaume-Uni (41) et en République d'Irlande (34), l'opossum (*Trichosurus vulpecula*) en Nouvelle Zélande (2), ainsi que plusieurs espèces sauvages en Afrique sont capables d'héberger l'infection à *M. bovis*. Le contrôle de la transmission à partir de la population d'animaux sauvages aux espèces de la ferme est complexe et, à ce jour dépend de la réduction ou de l'éradication de la population sauvage infectée. L'utilisation de la vaccination pour contrôler la maladie chez certaines espèces continue à être étudiée.

Mycobacterium bovis a été isolé chez des cervidés d'élevage et des cervidés vivant en liberté. La maladie peut être subaiguë ou chronique, avec un taux variable de progression. Un petit nombre d'animaux peuvent devenir sévèrement affectés en quelques mois d'infection, tandis que d'autres peuvent prendre plusieurs années pour développer des signes cliniques, en relation avec les lésions chez l'animal. Les lésions produites peuvent ressembler à celles trouvées chez les bovins (granulome évolutif, caséation, granulation et calcification avec le vieillissement). Les lésions peuvent prendre la forme d'abcès à parois minces avec peu de calcification et contenant un matériel purulent. Des abcès à paroi mince ont également été observés chez le lama. Chez les cervidés, la tuberculose doit être envisagée quand des lésions ressemblant à des abcès d'étiologie non connue sont observées. Les nœuds lymphatiques affectés sont habituellement ceux de la tête et du thorax. Les nœuds

lymphatiques mésentériques peuvent être atteints (de grand abcès peuvent être trouvés dans ce cas). La distribution des lésions dépend de la dose infectante, de la voie d'entrée de l'infection et de la période d'incubation avant examen.

Le test à la tuberculine peut être utilisé chez les cervidés d'élevage. Le test doit être effectué sur le côté du cou, après la tonte des poils au site du test, injection intradermique précise, et mesure de l'épaississement de la peau avant et après l'inoculation en utilisant un pied à coulisse pour obtenir des résultats qui soient valables (6).

Mycobacterium bovis peut causer des pertes économiques sévères dues à ses effets sur le bétail domestique et les infections zoonotiques. De plus, la présence de l'infection dans les populations sauvages fait peser une menace pour la survie des espèces sauvages en danger.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Quand les épreuves de diagnostic sont réalisées dans le cadre de programmes officiels de contrôle ou d'éradication de la tuberculose bovine, il est recommandé que les Services vétérinaires agréent :

- le(s) test(s) de diagnostic
- les laboratoires qui réalisent les tests et
- les personnes qui appliquent les techniques de diagnostic chez l'animal, à savoir l'intradermo-réaction

1. Identification de l'agent pathogène

Chez les bovins, la preuve clinique de la tuberculose manque d'habitude jusqu'à ce que se développent des lésions très étendues. Pour ces raisons, le diagnostic chez les animaux individuels et un programme d'éradication n'étaient pas possibles avant la mise au point de la tuberculine par Koch en 1890. La tuberculine, un filtrat de culture stérile concentré du bacille tuberculeux cultivé dans un bouillon de bœuf glyciné et, plus récemment, sur milieu synthétique, fournit un moyen de détecter la maladie.

Les réponses immunologiques aux infections à *M. bovis* chez les bovins sont étudiées dans l'espoir de développer ou d'améliorer des méthodes de diagnostic alternatives, comme le test cutané qui a quelquefois des inconvénients pratiques. Le dosage de l'interféron gamma semble prometteur en tant que test sanguin de diagnostic pour la tuberculose chez les bovins et les autres animaux (per ex. cerf, buffle) et est disponible dans le commerce. Le test de prolifération lymphocytaire et l'épreuve ELISA IgG₁ se sont révélés utiles comme épreuve complémentaire (pour renforcer la spécificité) ou comme épreuve parallèle (pour améliorer la sensibilité) chez les cerfs d'élevage.

La présence de *M. bovis* dans des échantillons cliniques et *post mortem* peut être mise en évidence par examen de frottis ou de coupes de tissu colorés et confirmée par culture de l'organisme sur milieu d'isolement primaire. Les récipients pour la collecte doivent être propres et de préférence stériles (l'utilisation de récipients d'échantillons contaminés par des mycobactéries de l'environnement peut aboutir à l'incapacité d'identifier l'infection à *M. bovis* en raison de la croissance rapide des mycobactéries de l'environnement) ; des récipients jetables à usage unique en plastique de capacité 50 ml peuvent être utilisés pour une variété de types d'échantillons. Les échantillons qui sont envoyés au laboratoire doivent être protégés et scellés pour empêcher les fuites, et emballés proprement pour résister à la casse ou à l'écrasement pendant le transit. Les Réglementations émises par l'Association internationale du transport aérien (IATA), concernant les Marchandises Dangereuses (DGR) et plus particulièrement le transport des échantillons potentiellement porteurs d'une maladie zoonotique suspecte, doivent être suivies. Les exigences sont résumées dans le Chapitre 1.1.1., «Prélèvement et expédition des échantillons pour le diagnostic ». La livraison rapide des échantillons au laboratoire améliore grandement les chances de réussir la culture de *M. bovis*. Si l'on prévoit des délais dans la distribution, les échantillons doivent être réfrigérés ou congelés pour retarder la croissance des contaminants et préserver les mycobactéries. Sous les climats chauds et quand la réfrigération n'est pas possible, l'acide borique peut être additionné (0,5 % [w/v] de concentration finale) comme agent bactériostatique, mais seulement pendant une période limitée, c'est-à-dire moins d'une semaine.

Des précautions doivent être prises pour prévenir l'infection des personnels du laboratoire (voir Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries »). Toutes les procédures impliquant la culture doivent être réalisées dans une hotte de sécurité biologique.

a) Examen microscopique

Mycobacterium bovis peut être observé microscopiquement sur des frottis directs à partir d'échantillons cliniques, et sur du matériel tissulaire préparé. La résistance à l'acide de *M. bovis* est

normalement mise en évidence par la coloration classique de Ziehl-Neelsen, mais une coloration fluorescente acido-alcool-résistante peut aussi être utilisée. Les techniques à l'immunoperoxydase peuvent aussi donner des résultats satisfaisants. Le diagnostic de présomption de mycobactériose peut être fait si le tissu présente des lésions histologiques caractéristiques (nécrose caséuse, minéralisation, cellules épithélioïdes, cellules géantes multinucléées et des macrophages). Comme les lésions contiennent souvent peu de bacilles, la présence des organismes acido-résistants dans des coupes histologiques peut ne pas être détectée bien que *M. bovis* puisse être isolé en culture.

b) Culture de *Mycobacterium bovis*

Pour traiter les échantillons pour la culture, le tissu est d'abord homogénéisé en utilisant un pilon et un mortier, un stomacher ou mixeur suivi par une décontamination avec soit un détergent, un acide ou une base, tel que le chlorure d'hexadécylpyridium (HPC) à 0,375–0,75 %, l'acide oxalique à 5 % ou l'hydroxyde de sodium à 2–4 %. Le mélange est agité pendant 10 min à la température du laboratoire puis neutralisé. Lors d'utilisation du HPC, l'étape de neutralisation n'est pas nécessaire. La suspension est centrifugée, le surnageant est éliminé, et le sédiment est utilisé pour la culture et l'examen microscopique.

Pour l'isolement primaire, le sédiment est habituellement inoculé sur une série de milieu solide à base d'œuf tel que les milieux de Lowenstein-Jensen, Coletso base ou Stonebrinks ; ces milieux contiennent soit du pyruvate, soit du pyruvate et du glycérol. Un milieu gélosé, tel que le milieu de Middlebrook 7H10 ou 7H11, ou un milieu gélosé au sang (10) doit aussi être utilisé.

Les cultures sont incubées pendant au moins 8 semaines (de préférence entre 10 et 12 semaines) à 37 °C avec ou sans CO₂. Les milieux doivent être distribués dans des tubes bien fermés pour éviter la dessiccation. Les pentes sont examinées pour une croissance macroscopique à intervalles réguliers pendant la période d'incubation. Quand la croissance est visible, des frottis sont préparés et colorés par la technique de Ziehl-Neelsen. La croissance de *M. bovis* apparaît généralement en 3 à 6 semaines d'incubation selon le milieu utilisé. *Mycobacterium bovis* pousse sur milieu de Lowenstein-Jensen sans pyruvate, mais pousse moins bien quand du glycérol est additionné.

Si une importante contamination du milieu de culture apparaît, ou si un échantillon montre un résultat de culture négative et des résultats macroscopiques et histologiques positifs, la culture doit être répétée en utilisant l'inoculum conservé après application d'une autre méthode de décontamination. Le facteur limitant dans l'isolement est souvent la pauvre qualité des échantillons soumis et des efforts doivent être faits pour s'assurer que le laboratoire reçoive des échantillons de bonne qualité.

Les mycobactéries sont repiquées sur milieux à base d'œufs et/ou à base d'agarose ou dans un bouillon Tween albumine et incubées jusqu'à ce qu'une croissance visible apparaisse. Dans certain laboratoire, de la bile de bœuf stérile est utilisée avant l'inoculation pour faciliter la dispersion des masses bactériennes en petites unités viables.

Les profils de croissance caractéristiques et la morphologie des colonies peuvent fournir un diagnostic de présomption de *M. bovis* ; cependant chaque isolat a besoin d'être confirmé. Il importe de distinguer *M. bovis* des autres membres du « complexe *tuberculosis* », à savoir *M. tuberculosis* (l'agent causal primaire de la tuberculose chez l'homme) *M. africanum* (qui occupe une position phénotypique intermédiaire entre *M. tuberculosis* et *M. bovis*) et *M. microti* (le bacille du campagnol, un organisme rarement rencontré).

L'identification des isolats est habituellement effectuée par détermination des propriétés culturales et biochimiques. Sur un milieu solide à base de pyruvate approprié, les colonies de *M. bovis* sont lisses et de couleur blanc cassé (chamois). Les organismes poussent lentement à 37 °C, mais ne poussent pas à 22 °C ou 45 °C. *Mycobacterium bovis* est sensible à l'hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique (TCH) et l'hydrazide de l'acide isonicotinique (INH). Ceci peut être testé par croissance sur milieu Middlebrook 7H10/7H11 ou sur milieu contenant de l'œuf. Le milieu à l'œuf doit être préparé sans pyruvate parce qu'il inhibe l'INH et pourrait avoir un effet similaire sur le TCH (qui est un analogue de l'INH) et ainsi donner des résultats faussement positifs (résistant). Les souches de *Mycobacterium bovis* sont aussi sensibles à l'acide para-amino salicylique et à la streptomycine. Les concentrations aux antibiotiques efficaces sont différentes pour les milieux à base d'œuf et gélosé. Les résultats pour la production de niacine et la réduction des nitrates sont négatifs pour *M. bovis*. Dans le test amidase, *M. bovis* est positif pour l'uréase et négatif pour la nicotinamidase et la pyrazinamidase. C'est une bactérie microaérophile et non chromogène.

Quelquefois *M. avium* ou d'autres mycobactéries de l'environnement peuvent être isolés à partir de lésions ressemblant à la tuberculose chez les bovins. Dans de tel cas, une identification soigneuse est nécessaire, et une infection mixte avec *M. bovis* doit être exclue. *Mycobacterium tuberculosis* peut sensibiliser les bovins à la tuberculine bovine sans causer des lésions tuberculeuses distinctes.

Les systèmes de cultures liquides tels que le Bactec sont utilisés en routine dans certains hôpitaux et laboratoires vétérinaires. La croissance est évaluée au moyen de la radiométrie ou de la fluorescence.

c) Méthodes de reconnaissance de l'acide nucléique

Une identification rapide des isolats pour vérifier qu'il appartient bien au « complexe *tuberculosis* » peut être réalisée par une sonde ADN complexe *tuberculosis* Gen Probe ou par réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) en ciblant les ARN 16S-23S, les séquences d'insertion IS6110 et IS1081, et les gènes codant les protéines spécifiques du complexe *M. tuberculosis*, tel que MPB70 et l'antigène b de 38kDa. L'identification spécifique de *M. bovis* peut se faire par PCR en ciblant une mutation au niveau du nucléotide 285 dans le gène *oxyR* (15, 26, 32, 35). D'autres méthodes de typage moléculaire telle que le « spoligotyping » (à partir de « spacer oligotyping »), permettent l'identification des isolats de *M. bovis* et fournissent des informations de typage moléculaire qui présentent un intérêt épidémiologique.

La PCR a été largement évaluée pour la détection du complexe *M. tuberculosis* dans des échantillons cliniques (principalement des crachats) de patients humains et a récemment été utilisée pour le diagnostic de la tuberculose chez les animaux. Plusieurs kits de diagnostic disponibles commercialement et des méthodes « maisons » variées ont été évaluées pour la détection du complexe *tuberculosis* dans des tissus frais et fixés. Des amorces variées ont été utilisées, comme cela a été décrit ci-dessus. Les produits d'amplification ont été analysés par hybridation avec des sondes ou par électrophorèse sur gel. Les kits de diagnostic commerciaux et les méthodes « maisons », sur les tissus frais, congelés ou préservés par l'acide borique, ont montré des résultats variables et moins que satisfaisants dans des comparaisons inter-laboratoires (31). Des résultats faussement positifs et faussement négatifs, particulièrement dans les échantillons contenant un faible nombre de bacilles, ont réduit la fiabilité de cette épreuve. La variabilité dans les résultats a été attribuée au faible nombre de copies de la séquence cible par bacille combiné à un faible nombre de bacilles. La variabilité a aussi été attribuée aux méthodes de décontamination, aux procédures de l'extraction de l'ADN, aux techniques pour l'élimination des inhibiteurs de l'enzyme polymérase, aux contrôles interne et externe et aux procédures pour la prévention des contaminations croisées. L'amélioration de la fiabilité de la PCR comme épreuve pratique pour la détection du complexe *tuberculosis* dans les échantillons cliniques frais exige la mise au point de procédures robustes et normalisées. Les contaminations croisées sont le plus grand problème de ce type de techniques et c'est pourquoi des témoins doivent être inclus lors de chaque amplification. Cependant, la PCR est maintenant utilisée en routine dans certains laboratoires pour la détection du groupe *M. tuberculosis* dans des tissus inclus dans de la paraffine (29, 30). Des résultats optimaux sont obtenus quand la PCR et les méthodes d'isolement sont utilisées ensemble.

Les empreintes génétiques permettent aux laboratoires de distinguer différentes souches de *M. bovis* et permet de décrire les profils d'origine, la transmission et la propagation de *M. bovis*. La méthode la plus largement utilisée est le « spoligotyping » (à partir de « spacer oligotyping »), qui permet la différenciation des souches à l'intérieur de chaque espèce appartenant au complexe *M. tuberculosis*, y compris *M. bovis*, et peut aussi distinguer *M. bovis* de *M. tuberculosis* (25). D'autres techniques qui pourraient être plus précises comprennent l'analyse de restriction par endonucléase (REA), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) utilisant la sonde IS6110, (notamment lorsqu'il existe plus de 3 à 4 copies de IS6110 dans l'isolat), la région du *direct repeat* (DR) et la sonde PGRS (la séquence poly G répétée) (40). Le RFLP utilisant une combinaison du DR et des sondes pUCD (33) et la caractérisation du profil du VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) (13, 14, 18, 27) ont été évalués récemment. Pour augmenter le pouvoir de discrimination entre les souches, il est possible d'utiliser une combinaison de techniques (11).

Le génome de *M. bovis* a été actuellement séquencé et cette information a conduit à améliorer les méthodes d'empreintes génétiques.

2. L'épreuve d'hypersensibilité retardée

• Épreuve à la tuberculine (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Dans le passé, la tuberculine CCMS (concentré à chaud sur milieu synthétique) était utilisée, mais, dans la plupart des pays, la tuberculine CCMS a été remplacée par la tuberculine dérivé protéique purifié (PPD). Les tuberculines CCMS peuvent avoir une bonne activité si elles sont correctement normalisées, mais leur spécificité est inférieure à celles des tuberculines PPDs. De plus, il a été démontré que les PPDs bovines préparées avec *M. bovis* souche AN5 sont plus spécifiques pour détecter la tuberculose bovine que les PPDs humaines préparées avec *M. tuberculosis*.

La méthode de référence pour la détection de la tuberculose bovine est l'épreuve à la tuberculine, qui implique l'injection intradermique de tuberculine PPD bovine et la détection postérieure de l'épaississement (hypersensibilité retardée) au site de l'injection 3 jours plus tard. Ceci peut être réalisé en utilisant de la tuberculine bovine seule ou dans une épreuve comparative en utilisant les tuberculines aviaire et bovine.

L'épreuve à la tuberculine est habituellement réalisée au milieu de l'encolure, mais l'épreuve peut aussi être réalisée au pli caudal. La peau de l'encolure est plus sensible à la tuberculine que la peau du pli caudal. Pour compenser cette différence, des doses plus fortes de tuberculine peuvent être utilisées au pli caudal.

L'hypersensibilité retardée peut ne pas apparaître au cours des 3 à 6 semaines suivant la contamination. Par conséquent, si un troupeau/animal est suspect d'avoir été en contact récemment avec des animaux infectés, le report de la mise en œuvre de l'épreuve doit être envisagé afin de réduire les risques de réponses faussement négatives. Étant donné que la sensibilité du test est inférieure à 100 %, il est peu probable que l'éradication de la tuberculose d'un troupeau puisse être obtenue avec seulement un test tuberculinique. Il faut souligner que lorsqu'il est utilisé sur des animaux infectés chroniques avec des lésions sévères, l'épreuve à la tuberculine peut ne pas donner de réponse.

L'épreuve à la tuberculine intradermique comparative est utilisée pour différencier les animaux infectés par *M. bovis* de ceux sensibilisés à la tuberculine bovine par suite de l'exposition à d'autres mycobactéries. Cette sensibilisation peut être attribuée à une réaction croisée antigénique parmi les espèces de mycobactéries et les genres apparentés. L'épreuve implique l'injection intradermique de tuberculine bovine et de tuberculine aviaire à différents sites, habituellement sur le même côté de l'encolure, et la mesure de la réponse 3 jours plus tard.

L'activité des tuberculines doit être estimée par des méthodes biologiques, estimation basée sur la comparaison avec des tuberculines étalons, et l'activité est exprimée en unités internationales (UI). Dans plusieurs pays, la tuberculine bovine est d'une activité acceptable si son activité estimée garantit chez les bovins au moins 2 000 UI (\pm 25 %) par dose bovine. Chez les bovins avec une sensibilité allergique diminuée, une dose plus élevée de tuberculine bovine est nécessaire, et dans des campagnes d'éradication nationale des doses jusqu'à 5 000 UI sont recommandées. Le volume de chaque dose injectée ne doit pas excéder 0,2 ml.

- **Protocole**

- i) Une technique d'injection correcte est importante. Les sites de l'injection doivent être tondus et nettoyés. Un pli de peau à l'intérieur de chaque aire tondue est mesuré avec un pied à coulisse et le site marqué avant l'injection. Une aiguille courte, à bord en biseau vers l'extérieur et une seringue graduée chargée avec la tuberculine, est insérée obliquement dans les couches plus profondes de la peau. La dose de tuberculine est ensuite injectée. La dose de tuberculine injectée ne doit pas être inférieure à 2 000 UI de tuberculine aviaire ou bovine. Une injection correcte est confirmée par palpation d'un petit épaississement de la taille d'un pois à chaque site de l'injection. La distance entre les deux injections doit être approximativement de 12 à 15 cm. Pour les jeunes animaux chez lesquels il n'y a pas de place pour séparer suffisamment les sites sur un côté de l'encolure, une injection doit être faite sur chaque côté du cou à sites identiques au centre du tiers moyen du cou. L'épaississement du pli de peau de chaque site d'injection est remesuré 72 h après l'injection. La même personne doit mesurer la peau avant l'injection et à la lecture de l'épreuve.
- ii) Plusieurs méthodes d'interprétation de la réaction cutanée ont été adoptées, qui reconnaissent que les réactions faussement positives peuvent être causées par la sensibilisation de l'animal par d'autres mycobactéries ou par une inflammation locale. Il convient de garder en mémoire qu'il existe un équilibre entre la sensibilité et la spécificité et qu'obtenir de grandes valeurs pour chacune d'elles n'est pas possible. Des politiques appropriées doivent être mises en place selon la prévalence de la maladie et en tenant compte du risque (à savoir lorsqu'un réservoir sauvage existe). L'interprétation est basée sur l'observation et l'enregistrement des augmentations de l'épaississement du pli de peau. Dans l'épreuve intradermique simple (qui exige une seule injection de tuberculine bovine), la réaction est généralement considérée comme négative si seulement un épaississement limité est observé, avec une augmentation inférieure à 2 mm et sans signes cliniques, tel qu'un œdème diffus ou étendu, exsudation, nécrose, douleur ou inflammation des conduits lymphatiques dans cette région ou des nœuds lymphatiques. La réaction est douteuse si aucun de ces signes cliniques n'est observé et si l'augmentation de l'épaississement du pli de peau est plus de 2 mm et moins de 4 mm. La réaction est positive si les signes cliniques, comme mentionnés ci-dessus, sont observés ou s'il y a une augmentation de 4 mm ou plus de l'épaisseur du pli de peau. De plus, dans des troupeaux infectés par *M. bovis*, un renflement visible ou palpable doit être considéré comme positif. Quelque fois une interprétation plus rigoureuse est utilisée, particulièrement dans les populations à haut risque ou au contact des animaux. Les animaux qui sont douteux à l'épreuve intradermique simple doivent être soumis à une autre épreuve après un intervalle de 42 jours, afin de permettre une diminution de la désensibilisation (dans certaines régions, des périodes d'attente de 60 jours pour les bovins et de 120 jours pour les cerfs sont retenues). Les animaux qui ne sont pas négatifs à la seconde épreuve doivent être jugés positifs à cette épreuve. Les animaux qui sont positifs à l'épreuve intradermique simple peuvent être soumis à une épreuve intradermique comparative ou un test sanguin. Toute répétition de l'épreuve doit être réalisée selon les normes des programmes de contrôle local ou national.

- iii) Dans l'interprétation de l'épreuve intradermique comparative, une réaction est habituellement positive si l'augmentation de l'épaississement de la peau au site de l'injection bovine est de 4 mm plus importante que la réaction montrée au site de l'injection aviaire. La réaction est douteuse si l'augmentation de l'épaississement de la peau au site de l'injection bovine est de 1 à 4 mm plus importante que la réaction aviaire. La réaction est négative si l'augmentation de l'épaississement de la peau au site de l'injection bovine est inférieure ou égale à l'augmentation de la réaction de la peau au site de l'injection aviaire. Ce schéma d'interprétation est utilisé dans les pays de l'Union Européenne (UE) et est recommandé dans la Directive du Conseil 64/432/CEE (16). Quelque fois une interprétation plus rigoureuse est utilisée.
- iv) Dans le pli sous caudal, une aiguille courte, à bord en biseau vers l'extérieur, est insérée obliquement dans les couches plus profondes de la peau sur la face latérale du pli caudal, à mi-chemin le long du pli et à mi-chemin entre la ligne des poils et la face ventrale du pli. L'interprétation classique est que n'importe quel changement palpable ou visible est jugé être une réaction. Une interprétation modifiée est aussi utilisée : une épreuve positive est n'importe quel renflement palpable ou visible au site de l'injection qui a une différence d'épaississement du pli caudal de 4 mm quand il est comparé à l'épaississement du plus caudal opposé. Si un animal a seulement un pli caudal, il est positif à l'épreuve si l'épaississement du pli caudal est de 8 mm ou plus.

3. Epreuves sérologiques

À côté de l'épreuve tuberculinique intradermique classique, des épreuves sérologiques de diagnostic sont utilisées (22). En raison du coût et de la nature plus complexe des essais basés au laboratoire, ils sont habituellement utilisés comme épreuves auxiliaires pour confirmer ou infirmer les résultats d'une épreuve cutanée intradermique. Il existe aussi des preuves qui établissent que la réaction sérologique est augmentée quand un animal infecté a subi une épreuve cutanée intradermique. Cela assure une meilleure discrimination des réponses sérologiques et, par conséquent, une plus grande exactitude des tests. Le dosage de l'interféron gamma et l'essai de prolifération des lymphocytes évaluent l'immunité cellulaire tandis que la méthode immuno-enzymatique (ELISA) mesure l'immunité humorale.

a) Dosage des interférons gamma

Dans ce dosage, la libération d'une lymphokine (interféron gamma – IFN- γ) est mesurée dans un système de culture de sang total. L'essai est basé sur la libération de l'IFN- γ à partir de lymphocytes sensibilisés pendant une période d'incubation de 16 à 24 h avec un antigène spécifique (tuberculine PPD). Cet essai se sert de la comparaison de la production de l'IFN- γ suivant la stimulation avec les PPD aviaire et bovine. La détection quantitative de l'IFN- γ bovin est effectuée avec un ELISA sandwich qui utilise deux anticorps monoclonaux (AcM) de l'IFN- γ bovin. Il est recommandé de transporter les échantillons de sang au laboratoire et de réaliser l'analyse aussitôt que possible et dans les 8 à 12 h après le prélèvement. Dans certaines régions, notamment là où la « non-spécificité » n'est pas négligeable, il convient de réfléchir à la précision du test. Cependant, étant donné la capacité du dosage de l'IFN- γ à détecter des infections récentes, l'utilisation en parallèle des deux tests permet le dépistage d'un plus grand nombre d'animaux infectés avant qu'ils ne deviennent une source de contamination de l'environnement (19). L'utilisation d'antigènes définis de mycobactéries tels que ESAT 6 et CFP-10, promet une amélioration de la spécificité (5). L'utilisation de tels antigènes pourrait aussi permettre de différencier entre animaux vaccinés et non-vaccinés. Chez les animaux qui sont difficiles ou dangereux à manipuler, tel que des bovins excitables ou autres bovidés, l'avantage du dosage de l'IFN- γ sur l'épreuve cutanée est que les animaux ont besoin d'être capturés une seule fois. L'utilisation du dosage de l'IFN- γ a été approuvée dans un certain nombre de programmes nationaux, notamment aux USA, Nouvelle-Zélande et Australie. En Nouvelle-Zélande, le dosage de l'IFN- γ est utilisé en série (amélioration de la spécificité) et en parallèle (augmentation de la sensibilité). Quand le dosage de l'IFN- γ est utilisé en série, les échantillons de sang peuvent être soumis au laboratoire jusqu'à 28 h après collecte (37).

b) Essai sur la prolifération des lymphocytes

Ce type d'essai *in vitro* compare la réactivité des lymphocytes du sang périphérique à la tuberculine PPD (PPD-B) et PPD de *Mycobacterium avium* (PPD-A). L'essai peut être réalisé sur du sang total (5) ou sur des lymphocytes purifiés à partir d'échantillons de sang périphérique (20). Ces épreuves s'efforcent d'augmenter la spécificité de l'essai par élimination de la réponse des lymphocytes aux antigènes « non spécifiques » ou des réactions croisées dues aux antigènes associés à des espèces de mycobactéries non pathogènes auquel l'animal peut avoir été exposé. Les résultats sont habituellement analysés comme la valeur obtenue en réponse à la PPD-B moins la valeur obtenue en réponse à la PPD-A. Puis la valeur B-A doit être au-dessus d'un point seuil qui peut être modifié pour porter au maximum soit la spécificité soit la sensibilité du diagnostic. L'essai a une valeur scientifique, mais il n'est pas utilisé comme diagnostic de routine parce que l'épreuve est longue et la logistique et la réalisation au laboratoire sont compliquées (il exige un temps d'incubation long et l'usage de nucléotides radioactifs). Comme pour le dosage de l'IFN- γ , la prolifération des lymphocytes devrait être réalisée peu de temps après récolte du sang. L'épreuve peut être utile chez les

animaux des parcs zoologiques et la faune sauvage. Une épreuve sérologique comprenant l'essai de transformation des lymphocytes et l'ELISA a été rapporté avoir une sensibilité et une spécificité élevées dans le diagnostic de l'infection à *M. bovis* chez les cervidés (20). L'épreuve est relativement chère et n'a pas encore été soumise à des comparaisons inter-laboratoires.

c) Méthode immuno-enzymatique

Il y a eu de nombreuses tentatives sans succès pour développer des épreuves sérologiques de diagnostic cliniquement utiles pour la tuberculose. L'ELISA apparaît être le meilleur des tests de détection des anticorps et peut être un complément, plutôt qu'une alternative, pour les épreuves basées sur l'immunité cellulaire. Elle peut être une aide chez les bovins anergiques et les cervidés. Un avantage de l'ELISA est sa simplicité, mais sa spécificité et sa sensibilité sont limitées chez les bovins, surtout dues au développement irrégulier et tardif de la réponse à l'immunité humorale chez les bovins au cours de la maladie. Cependant la réponse des anticorps chez les cervidés semble se développer plus tôt et de manière plus prédictive. Pour cette espèce, la sensibilité d'un ELISA comparatif a été rapportée atteindre 85 % (21). L'amélioration peut être possible en utilisant différents antigènes, y compris des protéines (ex. MPB 70, qui est très spécifique mais manque de sensibilité). D'ailleurs, chez les animaux infectés par *M. bovis*, une élévation anamnétique a été décrite, aboutissant à des résultats d'ELISA meilleurs 2 à 8 semaines après une épreuve cutanée de routine à la tuberculine. Une comparaison des niveaux des anticorps à la PPD-B et la PPD-A a aussi démontré être utile dans l'augmentation de la spécificité de l'ELISA (21). L'ELISA peut aussi être utile pour détecter les infections à *M. bovis* dans la faune sauvage. En Nouvelle Zélande, l'ELISA est approuvé comme une épreuve parallèle complémentaire pour les cervidés d'élevage, effectuée 13 à 33 jours après l'épreuve cutanée au milieu du cou (20).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

À présent le seul vaccin disponible contre les infections à *M. bovis* est le bacille Calmette Guérin (BCG), qui est une souche de *M. bovis* vivante atténuée. Il a montré une efficacité variable dans des essais chez les bovins, qui peut être attribuée à des facteurs variés y compris la formulation du vaccin, la voie de vaccination, et le degré d'exposition aux mycobactéries de l'environnement (39). Des essais ont été conduits sur un nombre d'autres vaccins, mais aucun n'a induit une protection supérieure au BCG. Il a été démontré que l'efficacité du BCG variait d'une manière semblable à celle rapportée pour l'homme. Un nombre de vaccins candidats nouveaux sont actuellement testés. L'ADN de l'organisme *tuberculosis* est maintenant étudié en détail et le séquençage du génome entier a été publié. Ceci peut être particulièrement utile dans l'identification des gènes associés à la virulence et dans l'avancée vers un vaccin ADN. Dans les pays infectés où il n'y a pas le schéma de contrôle test et abattage, la vaccination par le BCG peut être utilisée pour réduire l'étendue de l'infection chez les bovins. Avant de commencer un programme de vaccination, le programme de vaccination doit être optimisé pour les conditions locales. Un dosage typique serait de 10^4 à 10^6 unités formant colonies donné en sous-cutanée. Le vaccin doit reposer sur les souches de référence, BCG Pasteur ou Danois (43). Il est important de reconnaître que l'usage du vaccin compromettra les épreuves cutanées à la tuberculine ou d'autres épreuves immunologiques. La vaccination des bovins ne doit donc pas être utilisée dans les pays où sont en vigueur les mesures de contrôle ou de commerce qui reposent sur des épreuves semblables. Les vaccins BCG peuvent aussi être utilisés pour réduire la diffusion de *M. bovis* dans la faune sauvage qui constitue un réservoir de l'infection. Il est essentiel avant de faire de valider la méthode d'exécution pour des espèces sauvages particulières. L'impact du vaccin sur l'environnement doit aussi être pris en considération.

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 destinées à être générales et peuvent être complétées par des exigences régionales ou nationales.

Les tuberculines étaient des préparations faites à partir de produits de culture traités par la chaleur et lysé de *M. tuberculosis* ou *M. bovis* (connues comme tuberculines bovines et humaines, respectivement). Au début le milieu de culture utilisé pour leur production était un bouillon glycérol. En 1940, Les « tuberculines concentrées à chaud sur milieu synthétique » ou tuberculines CCMS, préparées à partir d'un milieu liquide synthétique, remplaçaient la « vieille » tuberculine. Actuellement la vieille tuberculine et la tuberculine CCMS ont été remplacées, presque partout dans le monde, par les dérivés protéiques purifiés ou PPD.

- **Production de la tuberculine**

1. **Gestion des semences bactériennes**

- a) **Caractéristiques de la semence bactérienne**

Les souches de *M. bovis* utilisées pour préparer la culture de la semence doivent être identifiées comme espèces par des épreuves appropriées. Un rapport doit être gardé sur leur origine et leur histoire postérieure. Les cultures de la semence ne doivent pas avoir subi plus de 5 passages. Les souches de production *M. bovis* AN5 ou Vallée sont les plus communément utilisées.

- b) **Méthode de culture**

Si la culture d'origine était cultivée sur milieu solide, Il est nécessaire d'adapter l'organisme à se développer comme une culture flottante (ex. en incorporant un morceau de pomme de terre stérile dans le flacon de culture du milieu liquide, tel que le milieu de Watson Reid). Quand la culture a été adaptée au milieu liquide, elle peut être utilisée pour produire le lot de semence principal, qui est conservé sous forme lyophilisée. Celle-ci est utilisée pour inoculer les milieux pour la production de lots de semence secondaires, qui ne doivent pas avoir subi plus de 4 passages à partir de la semence principale. La semence secondaire est utilisée pour inoculer les cultures de production (1, 23).

Le substrat de la culture de production doit être capable de produire un produit qui est conforme aux normes internationales reconnues (Organisation mondiale de la santé [OMS], la Pharmacopée Européenne ou autres autorités de contrôle reconnus). Il doit être libre d'ingrédients connus pour provoquer des réactions toxiques ou allergiques.

- c) **Validation de la semence candidate comme semence vaccinale**

Les souches de *M. bovis* utilisées pour la culture de la semence doivent être libres d'organismes contaminants.

Les lots de semence doivent être efficaces dans la production de tuberculine ayant une activité suffisante. Les épreuves nécessaires sont décrites dans la section C.4 ci-dessous.

2. **Méthode de fabrication**

L'organisme est cultivé dans un milieu synthétique, la protéine dans le filtrat est précipitée chimiquement (sulfate d'ammonium ou acide trichloracétique [TCA] sont utilisés), puis lavée et remise en suspension. La tuberculine PPD est recommandée comme elle peut être normalisée plus précisément.

Un conservateur antimicrobien qui ne provoque pas l'apparition de réactions faussement positives, tel que le phénol (pas plus que 0,5 % [w/v]), peut être additionné. Le glycérol (pas plus de 10 % [w/v]) ou le glucose (2,2 % [w/v]) peuvent être additionné comme stabilisateur. Les dérivés du mercure ne doivent pas être utilisés. Le produit est aussi distribué aseptiquement dans des récipients en verre neutre, stériles, qui sont scellés pour empêcher la contamination. Le produit peut être lyophilisé.

3. **Contrôles en cours de fabrication**

Les flacons de la production, inoculés à partir des cultures de semence convenables, sont incubés pendant une période de temps adéquate. Les flacons montrant des contaminations ou une culture anormale abondante doivent être éliminées après autoclavage.

Comme l'incubation se poursuit, la croissance en surface de beaucoup de cultures devient humide et peut couler dans le milieu ou dans le fond du flacon.

Pour les tuberculines PPD, le pH du précipité dissout (ainsi nommé tuberculine concentré) doit être de 6,6 à 6,7.

Le niveau de protéine de la PPD concentrée est déterminé par la méthode de Kjeldahl ou une autre méthode appropriée. L'azote total et l'azote précipité par le TCA sont habituellement comparés.

Le produit final doit être contrôlé biologiquement chez les cobayes. Les essais d'activité et spécificité sont effectués en comparaison avec une tuberculine de référence (PPD). En outre des dilutions sont faites avec un tampon selon le contenu en protéine et la concentration finale requise, habituellement de 1 mg/ml (1, 23).

4. Contrôles des lots

Les échantillons doivent se conformer aux normes reconnus officiellement pour la production de la tuberculine comme ordonné par la Pharmacopée Européenne ou les normes équivalentes.

a) Stérilité

Le test de stérilité est généralement réalisé selon les lignes directrices internationales (voir aussi le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »)

b) Innocuité

Deux cobayes, chacun ne pesant pas moins de 250 g, qui n'ont pas été traités antérieurement avec un matériel qui interfère avec le test, reçoivent une injection par voie sous-cutanée avec 0,5 ml de la tuberculine testée. Aucun effet anormal ne doit apparaître dans les 7 jours.

Les tests sur la tuberculine pour les mycobactéries vivantes peuvent être réalisés soit sur la tuberculine immédiatement avant qu'elle soit distribuée dans les derniers récipients ou sur des échantillons pris dans les récipients finaux eux-mêmes. Un échantillon d'au moins 10 ml doit être prélevé et injecté par voie intra-péritonéale dans au moins 2 cobayes, en divisant la dose entre eux. Il est souhaitable de prélever un échantillon plus grand, tel que 50 ml, et de concentrer les mycobactéries résiduelles par centrifugation ou filtration sur membrane. Les cobayes sont observés pendant au moins 42 jours et sont ensuite examinés macroscopiquement à l'autopsie. Les lésions trouvées sont examinées microscopiquement et par culture.

c) Effet sensibilisant

Pour tester l'effet sensibilisant, 3 cobayes qui n'ont pas été traités antérieurement avec un matériel qui pourrait interférer avec le test, sont injectés par voie intradermique avec l'équivalent de 500 UI de la préparation à tester sous un volume de 0,1 ml. Chaque cobaye, ensemble avec chacun des 3 cobayes 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 tuberculine. Les réactions des deux groupes de cobayes ne doivent pas être significativement différentes quand elles sont mesurées 24 à 28 h plus tard.

d) Activité

L'activité est déterminée par comparaison avec une préparation de référence de tuberculine bovine chez des cobayes sensibilisés avec *M. bovis*.

Dans les années 1970, les pays de la Communauté Economique Européenne (CEE, maintenant l'Union Européenne, UE) reconnaissaient un étalon pour les tuberculines CCMS bovine. Cet étalon CEE pour la tuberculine CCMS a une activité de 65 000 unités provisoires de tuberculine de la Communauté par ml.

Déjà dans les années 1960, la CEE reconnaissait un étalon pour la PPD bovine, qui avait une activité de 50 000 unités provisoires de tuberculine de la Communauté par mg de PPD, et était distribué à l'état lyophilisé. Malheureusement, le nombre d'ampoules lyophilisées n'était pas suffisant pour les besoins de l'OMS et donc il a été décidé de produire une nouvelle préparation de PPD bovine qui pourrait être désignée par l'OMS comme le nouvel étalon international pour les tuberculines PPD bovines.

Ce nouvel étalon pour les PPD bovines fut calibré par rapport à l'étalon CEE existant. Sur la base d'essais réalisés en collaboration au niveau international sur à la fois les cobayes et les bovins, il fut alors observé que le nouvel étalon pour les bovins avait une activité provisoire de 65 % par rapport à l'étalon de la CEE. Ainsi, en 1986, l'OMS décida officiellement d'attribuer à l'étalon international pour les tuberculines PPD bovines une activité de 32 500 UI/mg. Cela signifie que les unités provisoires de tuberculine de la Communauté sont équipotent en termes d'UI. Par la suite, la Pharmacopée Européenne a également reconnu l'étalon international de l'OMS pour les tuberculines PPD bovines.

Pour sauver le stock de l'étalon international réel, il est souhaitable que les pays où la tuberculine PPD bovine est produite, créent leur préparation de référence nationale propre pour la PPD bovine comme préparation de travail. Ces préparations de référence nationales doivent avoir été calibrées par rapport à l'étalon international officiel pour la PPD bovine, à la fois chez les cobayes et les bovins (28, 38, 42).

- **Normalisation chez les cobayes**

Les cobayes sont sensibilisés avec une faible dose (ex. 0,001 ou 0,0001 mg poids humide) de bacilles vivants d'une souche virulente de *M. bovis* 5 à 7 semaines avant l'essai. Les bacilles sont mis en suspension dans une solution saline physiologique, et une injection intramusculaire profonde de 1 ml est faite sur le côté médial de la cuisse. Au moment de l'essai, les cobayes infectés avec une faible dose de

M. bovis doivent encore être en bonne santé et les résultats des examens *post mortem* nombreux effectués rapidement après les essais de normalisation devront montrer que les cobayes ne souffraient pas de tuberculose ouverte et ainsi n'excrétaient pas de bacilles tuberculeux.

Une alternative, mais moins fiable, le test d'activité n'utilise pas de mycobactéries pathogènes vivantes et est plus approprié pour les laboratoires qui n'ont pas de zone d'isolement pour le logement sans danger des cobayes infectés. Ce test d'activité de la tuberculine est réalisé comme suit : Les tuberculines PPD produites sont testées biologiquement chez des cobayes sensibilisés de manière homologue contre l'étalon pour la tuberculine PPD bovine par un essai en 8 points comprenant 4 dilutions correspondant à environ 20, 10, 5 ou 2,5 UI. Le volume de l'injection est 0,1 ml. Dans ce test, deux épreuves tuberculiniques sont comparées avec la tuberculine étalon chez 8 cobayes, effectuant 8 injections intradermiques par animal et employant un carré latin. Les cobayes sont sensibilisés avec des bacilles inactivés de *M. bovis*, 5 à 7 semaines avant l'essai. Les bacilles sont mis en suspension dans du tampon et transformé en émulsion avec de l'adjuvant de Freund incomplet. Une injection intramusculaire profonde est faite sur le côté médial de la cuisse, en utilisant une dose de 0,5 ml.

Un essai approprié pour l'activité est comme suit : les tuberculines PPD produites sont testées biologiquement chez des cobayes sensibilisés de manière homologue contre l'étalon pour la tuberculine PPD bovine par un essai en 6 points comprenant 3 dilutions à intervalles de 5 de chaque tuberculine. Les dilutions des préparations de tuberculine sont faites dans une solution tampon isotonique contenant 0,0005 % (w/v) de polysorbate 80 (Tween 80). Des volumes de 0,001 ; 0,0002 et 0,00004 mg de tuberculoprotéine correspondant à la norme internationale pour la PPD à 32, 6,4 et 1,28 UI, respectivement, sont choisies parce que ces quantités donnent des réactions cutanées bien lisibles avec des limites acceptables. Le volume de l'injection est 0,2 ml. Dans un essai, deux épreuves à la tuberculine sont comparées avec la tuberculine étalon chez 9 cobayes, en effectuant 8 injections intradermiques par animal et en employant un carré latin équilibré incomplet (17).

Normalement, la lecture des essais est faite 24 h après l'injection des tuberculines, mais une seconde lecture additionnelle peut être réalisée après 48 h. Les diamètres différents de l'érythème sont mesurés avec un pied à coulisse en millimètres et enregistrés sur des feuilles d'essai. Les résultats sont évalués statistiquement en utilisant des méthodes statistiques classiques pour des essais en parallèle selon Finney (17). Les activités relatives de deux épreuves tuberculiniques sont calculées avec un intervalle de confiance de 95 %, les pentes du log dose-réponse font une courbe pour chaque préparation (augmentation de la réaction moyenne par unité augmentation du log dose) et pour les rapports F pour les déviations à partir du parallélisme.

D'après la Pharmacopée Européenne, l'activité estimée pour les tuberculines bovines ne doit pas être inférieure à 66 % et pas supérieure à 150 % de l'activité indiquée sur l'étiquette.

- **Normalisation de la tuberculine bovine chez les bovins**

Selon le rapport technique de l'OMS Séries N°384, le test d'activité doit être réalisé chez l'espèce animale et dans les conditions dans lesquelles les tuberculines seront utilisées en pratique (42). Ceci signifie que les tuberculines bovines doivent être testées chez des bovins tuberculeux infectés naturellement. Comme cette exigence est difficile à accomplir, le test de l'activité en routine est réalisé chez des cobayes. Cependant, tester périodiquement chez les bovins tuberculeux est nécessaire et des préparations normalisées exigent toujours d'être calibrées chez les bovins. La fréquence du test chez les bovins peut être réduite s'il est certain que les préparations normalisées sont représentatives des tuberculines issues de la routine et que les procédés de production garantissent la cohérence.

Un essai d'activité approprié pour les tuberculines bovines chez les bovins est comme suit : les tuberculines à tester sont titrées contre un étalon pour la tuberculine PPD bovine par un essai de 4 points utilisant deux dilutions à intervalles de 5 de chaque tuberculine. Pour la normalisation, 0,1 et 0,02 mg de tuberculoprotéine sont injectés puisque ces volumes correspondent à environ 3 250 et 650 UI si l'étalon international pour la tuberculine PPD bovine est utilisé. Les tuberculines à tester sont diluées de telle façon que les mêmes poids de protéine soient appliqués. Le volume de l'injection est de 0,1 ml, et la distance entre les sites de l'injection au milieu de l'aire cervicale est de 15 à 20 cm. Dans un essai, 3 tuberculines à tester sont comparées avec la tuberculine étalon chez 8 bovins tuberculeux, en appliquant 8 injections intradermiques par animal sur les deux côtés du cou, et en employant un carré latin complet équilibré. L'épaisseur de la peau au site de chaque injection est mesurée avec un pied à coulisse en dixième de millimètre, aussi exactement que possible, avant et 72 h après l'injection (24).

Les résultats sont statistiquement évalués en utilisant les mêmes méthodes de référence pour les essais en parallèle que celles employées dans les tests d'activité chez les cobayes.

e) Spécificité

Un essai approprié pour la spécificité est comme suit : 3 tuberculines bovines à tester sont titrées contre l'étalon pour la tuberculine PPD aviaire (ou 3 tuberculines aviaires à tester contre l'étalon pour la tuberculine PPD bovine) par un essai à 4 points chez des cobayes sensibilisés de manière hétérologue, comprenant deux dilutions à intervalles de 25 de chaque tuberculine. Les quantités de 0,03 mg et 0,0012 mg de tuberculoprotéine testée, correspondant à approximativement 1 500 et 60 UI, sont choisies parce que ces quantités donnent des réactions cutanées bien lisibles. Les doses d'injection de l'étalon sont plus basses, à savoir 0,001 mg et 0,0004 mg. Dans un essai, 3 tuberculines à tester sont comparées avec la tuberculine étalon chez 8 cobayes en appliquant 8 injections intradermiques par animal et en employant un carré latin complet équilibré. La lecture des résultats et l'évaluation statistique sont identiques à celles du test d'activité.

f) Stabilité

Pourvu que les tuberculines accèdent aux normes législatives exigées pour la production et soient stockées à une température entre 2 °C et 8 °C et protégées de la lumière, elles peuvent être utilisées jusqu'à la date d'expiration comme spécifié dans la licence de production de la tuberculine. Pour un stockage à long terme, il est recommandé de garder la PPD sous une forme concentré plutôt que sous une forme diluée et le concentré doit aussi être stocké à l'obscurité.

g) Contrôle du pH

Le pH doit être entre pH 6,5 et 7,5.

h) Teneur en protéine

La teneur en protéine est déterminée comme indiqué dans la section C.3., « Contrôle en cours de fabrication ».

i) Stockage

Pendant le stockage, la tuberculine bovine liquide doit être protégée de la lumière et maintenue à une température de 5 °C ± 3 °C. La congélation du produit liquide peut compromettre la qualité. Cependant, il est possible d'obtenir des préparations lyophilisées qui peuvent être stockées à des températures plus élevées (mais ne pas excéder 25 °C) et protégées de la lumière. Les périodes d'exposition à des températures plus élevées ou à la lumière directe du soleil doivent être réduites au minimum.

j) Agents de conservation

Les agents de conservation antimicrobiens ou autres substances qui peuvent être additionnés à une tuberculine doivent avoir montré ne pas détériorer la sécurité et l'efficacité du produit.

La concentration maximum permise pour le phénol est 0,5 % (w/v) et pour le glycérol il est de 10 % v/v.

k) Précautions d'emploi et Mise en garde

L'expérience à la fois chez l'homme et l'animal conduit à l'observation que la tuberculine convenablement diluée, injectée par voie intradermique, aboutit à une réaction localisée au point d'injection sans manifestations généralisées. Même chez des individus très sensibles, des réactions généralisées sévères sont extrêmement rares et limitées. Mais l'expérience a montré qu'un opérateur hypersensible peut avoir des signes généralisés sévères après un contact intradermique accidentel (blessure avec aiguille) avec la tuberculine bovine. Ces individus doivent être informés de ne pas effectuer l'épreuve cutanée à la tuberculine avec la dose élevée de 2 000 à 5 000 UI de tuberculine, qui est environ 1 000 fois la dose humaine normale de 5 UI.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Un test pour l'absence de propriétés toxique ou irritante doit être effectué (voir 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 une préparation de référence de tuberculine du même type (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. ANIMAL HEALTH DIVISION (NEW ZEALAND) (1986). Possum research and cattle tuberculosis. *Surveillance*, **13**, 18–38.
3. ARANAZ A., COUSINS D., MATEOS A. & DOMINIGUEZ L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1785–1789.
4. BENGIS R.G., KRIEK N.P.J., KEET D.F., RAATH J.P., DE VOS V. & HUCHZERMAYER H.F.A.K. (1996). An outbreak of tuberculosis in a free-living African buffalo (*Syncerus caffer*, Sparman) population in the Kruger National Park: A preliminary report. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **63**, 15.
5. BUDDLE B.M., RYAN T.J., POLLOCK J.M., ANDERSON P. & DE LISLE G.W. (2001). Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet. Microbiol.*, **80**, 37–46.
6. CLIFTON-HADLEY R.S. & WILESMITH J.W. (1991). Tuberculosis in deer: a review. *Vet. Rec.*, **129**, 5–12.
7. COUSINS D.V. (2001). *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 71–85.
8. COUSINS D.V., BASTIDA R., CATALDI A., QUSE V., REDROBE S., DOW S., DUIGNAN P., MURRAY A., DUPONT C., AHMED A., COLLINS D.M., BUTLER W.R., DAWSON D., RODRIGUEZ D., LOUREIRO J., ROMANO M.I., ALITO A., ZUMARRAGA M. & BERNARDELLI A. (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1305–1314.
9. COUSINS D.V. & FLORISSON N. (2005). A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24** (3).
10. COUSINS D.V., FRANCIS B.R. & GOW B.L. (1989). Advantages of a new agar medium in the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.*, **20**, 89–95.
11. COUSINS D.V., SKUCE R.A., KAZWALA R.R. & VAN EMBDEN J.D.A. (1998). Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **2**, 471–478.
12. DE LISLE G.W., MACKINTOSH C.G. & BENGIS R.G. (2001). *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 86–111.
13. DURR P.A., CLIFTON-HADLEY R.S. & HEWINSON R.G. (2000). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. II. Applications of genotyping. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **19**, 689–701.
14. DURR P.A., HEWINSON R.G. & CLIFTON-HADLEY R.S. (2000). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I. *Mycobacterium bovis* genotyping. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **19**, 675–688.
15. ESPINOSA DE LOS MONTEROS L.E., GALAN J.C., GUTIERREZ M., SAMPER S., GARCIA MARIN J.F., MARTIN C., DOMINGUEZ L., DE RAFAEL L., BAQUERO F., GOMEZ-MAMPASO E. & BLAZQUEZ J. (1998). Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *M. tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 239–242.
16. EUROPEAN UNION. Directive 80/219, amending Directive 64/432, Annex B.
17. FINNEY D.J. (1964). Statistical Methods in Biological Assays, Second Edition. Charles Griffin, London, UK.
18. FROTHINGHAM R. & MEEKER-O'CONNELL W.A. (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem. *Microbiology*, **144**, 1189–1196.
19. GORMLEY E., DOYLE M.B., FITZSIMONS T., MCGILL K. & COLLINS J.D. (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet. Microbiol.*, **112** (2–4), 171–179.

20. GRIFFIN J.F.T., CROSS J.P., CHINN D.N., ROGERS C.R. & BUCHAN G.S. (1994). Diagnosis of tuberculosis due to *M. bovis* in New Zealand red deer (*Cervus elaphus*) using a composite blood test (BTB) and antibody (ELISA) assays. *N. Z. Vet. J.*, **42**, 173–179.
21. GRIFFIN J.F.T., HESKETH J.B., MACKINTOSH C.G., SHI Y.E. & BUCHAN G.S. (1993). BCG vaccination in deer: distinctions between delayed type hypersensitivity and laboratory parameters of immunity. *Immunol. Cell Biol.*, **71**, 559–570.
22. HAAGSMA J. (1993). Working Paper on Recent Advances in the Field of Tuberculosis Control and Research. World Health Organization Meeting on Zoonotic Tuberculosis with Particular Reference to *Mycobacterium bovis*, 15 November 1993, Geneva, Switzerland.
23. HAAGSMA J. & ANGUS R.D. (1994). Tuberculin production. In: *Mycobacterium bovis* Infections in Humans and Animals, Steele J.H. & Thoen C.O., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
24. HAAGSMA J., O'REILLY L.M., DOBBELAAR R. & MURPHY T.M. (1984). A comparison of the relative potencies of various bovine PPD tuberculin in naturally infected tuberculous cattle. *J. Biol. Stand.*, **10**, 273.
25. HEIFETS L.B. & JENKINS P.A. (1998). Speciation of *Mycobacterium* in clinical laboratories. In: *Mycobacteria I. Basic Aspects*, Gangadharam P.R. & Jenkins P.A., eds. Chapman and Hall, New York, USA, 308–350.
26. HUARD R.C., DE OLIVEIRA LAZZARINI L.C., BUTLER W.R., VAN SOOLINGEN D. & Ho J.L. (2003). PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J. Clin. Microbiol.*, **41** (4), 1637–1650.
27. KAMERBEK J., SCHOULS L., KOLK A., VAN AGTERVELD M., VAN SOOLINGEN D., KUIJPER S., BUNSCHOTEN A., MOLHUIZEN H., SHAW R., GOYAL M. & VAN EMBDEN J. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 907–914.
28. MAXILD J., BENTZON M.W., MOLLER S. & ZACHARIASSEN P. (1976). Assays of different tuberculin products performed in guinea pigs. *J. Biol. Stand.*, **4**, 171.
29. MILLER J., JENNY A., RHGYAN J., SAARI D. & SAUREZ D. (1997). Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *M. tuberculosis* complex organisms. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 244–249.
30. MILLER J., JENNY A. & PAYEUR J. (2002). Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium bovis* and *M. avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative organisms. *Vet. Micro.*, **2328**, 1–9.
31. NOREDHOEK G.T., VAN EMBDEN J.D.A. & KOLK A.H.J. (1996). Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2522–2525.
32. NIEMANN S., HARMSSEN D., RUSCH-GERDES S. & RICHTER E. (2000). Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by gyrB DNA sequence polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **38** (9), 3231–3234.
33. O'BRIAN R., DANILOWICZ B.S., BAILEY L., FLYNN O., COSTELLO E., O'GRADY D. & RODGERS M. (2000). Characterisation of the *Mycobacterium bovis* restriction fragment length polymorphism DNA probe pUCD and performance comparison with standard methods. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 3362–3369.
34. O'REILLY L.M. & DABORN C.J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle Lung Dis.* (Suppl. 1), **76**, 1–46.
35. PARSONS L.M., BROSCHE R., COLE S.T., SOMOSKOVI A., LODER A., BRETZEL G., VAN SOOLINGEN D., HALE Y.M. & SALFINGER M. (2002). Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **40** (7), 2339–2345.
36. PRODINGER W.M., BRANDSTATTER A., NAUMANN L., PACCIARINI M., KUBICA T., BOSCHIROLI M.L., ARANAZ A., NAGY G., CVETNIC Z., OCEPEK M., SKRYPNYK A., ERLER W., NIEMANN S., PAVLIK I. & MOSER I. (2005). Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 4984–4992.

37. RYAN T.J., BUDDLE B.M. & DE LISLE G.W. (2000). An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res. Vet. Sci.*, **69**, 57–61.
38. SCHNEIDER W., DOBBELAER R., DAM A., JORGENSEN J.B., GAYOT G., AUGIER J., HAAGSMA J., REES W.H.G., LESSLIE I.W. & HEBERT C.N. (1979). Collaborative assay of EEC standards for bovine tuberculin. *J. Biol. Stand.*, **7**, 53.
39. SKINNER M.A., WEDLOCK D.N. & BUDDLE B.M. (2001). Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. *Mycobacterial Infections in Domestic and Wild Animals. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20**, (in press).
40. SKUCE R.A., BRITAIN D, HUGHES M.S. & NEILL S.D. (1996). Differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates from animals by DNA typing. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 2469–2474.
41. WILESMITH J.W. (1991). Epidemiological methods for investigating wild animal reservoirs of animal disease. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **10**, 205–214.
42. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1987). Requirements for Biological Substances No. 16, Annex 1: Requirements for Tuberculins. Technical Report Series No. 745, WHO, Geneva, Switzerland, 31–59.
43. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)/OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (1994). Report on Consultation on Animal Tuberculosis Vaccines. WHO, Veterinary Public Health Unit, Geneva. WHO/CDS/VPH/94.138.

*

* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la tuberculose 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).

DIARRHÉE VIRALE BOVINE

RÉSUMÉ

Les bovins de tout âge sont sensibles à l'infection par le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV : Bovine viral diarrhoea virus) (cf. également chapitre 4.5. du Code sanitaire pour les animaux terrestres, « Collecte et traitement de la semence de bovins et de petits ruminants »). Le virus est présent dans le monde entier. Les signes cliniques peuvent aller d'une infection subclinique jusqu'à la maladie des muqueuses, affection rapidement fatale. Des atteintes aiguës peuvent provoquer de la diarrhée transitoire ou de la pneumonie, en général sous forme épidémique. Certaines formes aiguës associées à des taux de mortalité importants ont également été décrites. Ces dernières sont souvent, mais pas toujours, associées à un syndrome hémorragique. Cependant, la plupart des infections du jeune bovin sont subcliniques et passent inaperçues. Le virus se transmet principalement par contact direct entre bovins. La transmission verticale joue un rôle important dans l'épidémiologie et la pathogénie de l'infection.

L'infection d'un fœtus bovin peut provoquer des avortements, la naissance de mort-nés, des effets tératogènes ou l'infection persistante d'un veau nouveau-né. Les animaux en virémie persistante peuvent naître faibles et apathiques ou, par contre, sembler totalement normaux et sains, et de ce fait, ne pas être identifiés cliniquement. Certains de ces animaux développeront par la suite la maladie des muqueuses, avec de l'anorexie, des ulcérations gastro-intestinales et une diarrhée profuse, menant invariablement à la mort. La maladie des muqueuses n'apparaît que chez les animaux infectés de façon persistante.

Il est très important d'éviter le commerce d'animaux virémiques. Un animal sérologiquement positif et non virémique est en général considéré comme « sûr » à condition qu'il ne s'agisse pas d'une femelle gestante. Les vaches séropositives portant des fœtus infectés de manière persistante sont un facteur important dans la transmission du virus entre troupeaux. À peu près 15 % des animaux virémiques persistants possèdent des anticorps contre la protéine NS2 ; le pourcentage d'animaux virémiques persistants possédant des anticorps contre la glycoprotéine E2 est plus faible. La séropositivité d'un animal ne peut donc pas être assimilée à son innocuité. En général, les infections latentes ne sont pas décrites chez des animaux après la guérison d'une infection aiguë. Cependant, le sperme d'animaux infectés de façon aiguë, et très rarement, d'animaux guéris pourrait être infectieux.

Identification de l'agent pathogène : *le BVDV est un pestivirus de la famille des Flaviviridae, proche de la peste porcine classique et de la « maladie des frontières » (Border disease) chez les petits ruminants. Il existe deux biotypes du BVDV : le biotype non-cytopathogène et le biotype cytopathogène. Par ailleurs, il existe deux génotypes différents du point de vue antigénique (le type 1 et le type 2), et les isolats viraux de ces deux types présentent une diversité biologique et antigénique considérable.*

Les animaux d'aspect sain, mais en virémie persistante suite à une infection congénitale peuvent être identifiés par l'isolement de virus non-cytopathogène en culture de cellules suite à un prélèvement de sang ou de sérum. Il est nécessaire d'utiliser une méthode d'identification immunologique afin de détecter la multiplication du virus en culture cellulaire. Des méthodes alternatives basées sur la détection directe de l'antigène viral ou de l'ARN viral dans les leucocytes existent également. La persistance du virus devrait être confirmée par un second prélèvement effectué après un intervalle d'au moins 3 semaines. Les animaux en virémie persistante n'auront en général pas ou peu d'anticorps contre le BVDV.

La virémie des cas aigus est transitoire et difficile à détecter. Lors d'atteinte mortelle par la maladie hémorragique, le virus peut être isolé post mortem dans les tissus. La maladie des muqueuses peut être confirmée en isolant le biotype cytopathogène du BVDV, principalement à partir de tissus intestinaux. Le virus non-cytopathogène peut également être détecté, surtout dans le sang.

Épreuves sérologiques : *La meilleure confirmation d'une infection aiguë par le BVDV se fait en démontrant une séroconversion grâce au couplage de prélèvements sérologiques de plusieurs animaux du troupeau. L'analyse de ces sérums couplés (d'animaux en phase aiguë et en phase de convalescence) devrait être effectuée à au moins 21 jours d'intervalle, et les échantillons d'un même animal devraient être testés en même temps. Les tests immuno-enzymatiques (ELISA) pour la détection d'anticorps (ELISA indirect) et de séroneutralisation virale sont les méthodes les plus fréquemment utilisées.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *il n'y a pas de vaccin de référence contre le BVDV. Un grand nombre de préparations commerciales sont cependant disponibles. Vu le risque de transmission transplacentaire, les vaccins à virus vivant atténué ne devraient pas être administrés aux vaches gestantes, ni aux veaux à la mamelle. Ces vaccins risquent également d'induire une maladie des muqueuses chez des animaux infectés de façon persistante. Les vaccins à virus inactivé nécessitent souvent une seconde injection. Le vaccin idéal devrait être capable d'empêcher la transmission transplacentaire chez les vaches gestantes.*

L'infection par le BVDV de lots de sérum fœtal bovin utilisé comme complément dans les milieux de culture est fréquente ; le BVDV représente donc un risque particulièrement important lors de transfert d'embryon et dans la fabrication de produits biologiques pour d'autres maladies.

A. INTRODUCTION

Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV : Bovine viral diarrhoea virus) est un pestivirus de la famille des *Flaviviridae*. Il est très proche des virus de la peste porcine classique et de la maladie des frontières (*Border disease*) ovine (23). Il existe deux génotypes de BVDV antigéniquement différents, avec des différences démontrables par analyse génétique : le type 1 et le type 2 (74). Les deux génotypes se distinguent l'un de l'autre ainsi que des autres pestivirus grâce à des anticorps monoclonaux (AcM) dirigés contre les principales glycoprotéines, E2 et E^{RNS}, ou par de l'analyse génétique (65, 68). Le typage viral à partir d'échantillons sanguins est possible grâce à des réactions d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) multiplex (33). Le virus de type 1 est en général plus fréquent, même si, aux États-Unis d'Amérique, la prévalence du virus de type 2 semble être comparable à celle du type 1. Il existe des formes non-cytopathogènes et cytopathogènes (biotypes) pour les deux génotypes. La subdivision des biotypes se fait selon que le virus induit ou non des modifications visibles en culture cellulaire. Habituellement, c'est le virus non-cytopathogène qui circule dans les exploitations bovines. Chaque biotype joue un rôle spécifique dans un grand nombre de syndromes cliniques, aigus, congénitaux et d'infections chroniques (5, 11). Les virus de type 2 sont en général non-cytopathogènes et sont associés à des épidémies d'infections aiguës sévères et un syndrome hémorragique (16). Cependant, des virus de type 2 récemment isolés au Royaume-Uni ont été associés à des maladies indistinguables de celles habituellement observées et dues au type 1. Certains isolats du type 1 ont été associés à des foyers de maladies particulièrement sévères et fatales chez des bovins adultes (20). Des infections cliniquement inapparentes ou bénignes ont fréquemment lieu avec les deux génotypes.

Bien que la maladie soit très répandue, le contrôle de la diarrhée virale bovine peut être envisagé au niveau du troupeau, et même au niveau national, comme cela a été démontré par les progrès réalisés par de nombreux pays européens vers l'éradication (56).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

a) Infections aiguës

Les infections aiguës chez les bovins surviennent principalement chez les jeunes animaux. Elles peuvent être subcliniques ou associées à de la diarrhée (1). Les animaux atteints peuvent présenter des prédispositions à l'atteinte par d'autres maladies, par exemple la fièvre des transports qui pourrait être due à un effet immunodépresseur du BVDV. Les taureaux peuvent présenter une diminution momentanée de leur fertilité, ainsi qu'une excrétion transitoire du virus par le sperme (62). Les vaches peuvent également être atteintes d'infertilité, probablement associée à certains changements de la fonction ovarienne (35) et à des sécrétions de gonadotrophine et de progestérone (30). Lors d'infection aiguë, une virémie brève peut être décelée, et une excrétion du virus peut se faire via le jetage. Il peut également y avoir une leucopénie

passagère, de la thrombocytopénie ou de la fièvre, mais l'existence de ces signes varie fortement d'un animal à l'autre. La réponse sérologique est la façon la plus sûre de diagnostiquer le passage récent d'une infection aiguë. Lors d'atteinte par le BVDV, la morbidité est souvent élevée et la mortalité faible, même si des cas d'atteinte plus sévère existent (12). Des épidémies de formes sévères d'infections aiguës ont notamment été décrites de façon sporadique dans certains pays (1, 6). Les animaux présentaient alors des lésions hémorragiques, de la thrombocytopénie, et une mortalité élevée. En effet, il a été montré que l'infection par le virus de type 2 provoquait des altérations de la fonction plaquettaire (76). Lors d'autres infections aiguës, de la fièvre, de la pneumonie, de la diarrhée, des morts subites dans toutes les classes d'âge peuvent survenir, en combinaison avec des signes hémorragiques (16).

b) Infections congénitales

Si un virus non-cytopathogène infecte le fœtus bovin, il peut en résulter un avortement, un veau mort-né, des effets tératogènes ou une infection congénitale qui persistera chez le veau nouveau-né (1, 11, 26, 55). La confirmation du BVDV comme cause d'avortement est souvent difficile (69), mais le virus peut être isolé des tissus fœtaux dans certains cas, ou un antigène ou le génome viral peut être mis en évidence. Il faut également essayer de détecter des anticorps spécifiques dans les échantillons de fluides fœtaux, de sérum ou de liquide de suspension de tissus. La mortinatalité et les effets tératogènes peuvent être liés à une réponse immunitaire active du fœtus suite à une infection par le virus au cours de la seconde moitié de la gestation. Les vaches présentent alors souvent des titres élevés en anticorps ($> 1/2\ 000$) dirigés contre le BVDV, ce qui suggère une infection fœtale et est probablement dû au fait que le fœtus transmet une charge virale importante à sa mère (47).

Même si l'infection congénitale par le BVDV mène souvent à l'avortement, elle n'est pas toujours identifiée dans la pratique. En effet, une infection survenant au cours du premier tiers de gestation peut donner lieu à une résorption embryonnaire, qui passe souvent inaperçue auprès de l'exploitant. La vache revient en chaleurs, et l'échec de la gestation sera considéré comme une mort embryonnaire précoce. Une autre possibilité est la mort et la résorption des fluides fœtaux, ce qui résulte en une momification fœtale. Il est fréquemment observé que les fœtus avortons présentent de l'œdème sous-cutané et des épanchements pleuraux et péritonéaux abondants. Certaines anomalies congénitales peuvent également provoquer des retards de croissance, des atteintes sélectives du système nerveux central (SNC) tels que l'hypoplasie cérébelleuse et la démyélinisation (70), et des malformations oculaires telles que la cataracte et l'atrophie rétinienne. Parfois ils souffrent d'anomalies du squelette, dont la plus grave est l'arthrogrypose.

La mortinatalité est une conséquence fréquente des infections congénitales au cours des 150 premiers jours de la gestation ; les veaux semblent normalement développés à la naissance, mais ne survivent pas. Cependant, dans de nombreux cas, il n'est pas possible d'isoler le BVDV de ces animaux et les tests PCR sont négatifs. Après le 150^e jour de gestation, le système immunitaire du veau sera pleinement développé et l'infection du veau donnera habituellement lieu à une production d'anticorps et à la naissance d'un veau normal.

c) Infection persistante

Lorsque le fœtus est infecté aux alentours du 110^e jour de gestation et avant qu'il ne soit immunocompétent, il peut naître avec une infection persistante. Ces animaux sont facilement identifiés en détectant le BVDV non-cytopathogène dans le sang. Le virus peut également être mis en évidence par immunohistochimie au niveau de la peau. De plus, les animaux ayant une infection persistante ne possèdent pas d'anticorps spécifiques. Le diagnostic sérologique peut cependant être compliqué chez les veaux de moins de 3 mois par la présence d'anticorps anti-BVDV maternels. Ces anticorps maternels peuvent également interférer avec l'isolement viral. Chez les animaux infectés persistants plus âgés, de faibles taux d'anticorps peuvent être montrés, suite à leur capacité de produire des anticorps contre des souches (y compris des souches vaccinales) de BVDV « hétérologues » (antigéniquement différentes) du virus provoquant la virémie persistante (12). Afin de confirmer le diagnostic d'infection persistante, les animaux devraient être re-testés après un intervalle de 3 semaines.

Il n'y a pas de lésions pathognomoniques chez le veau virémique. Selon l'âge au moment de l'infection *in utero*, les lésions pourront être dues uniquement à l'effet du virus sur les cellules en cours de différenciation du fœtus, ou dues à la réponse du système immunitaire du fœtus en cours de développement ou dues aux deux. Les signes cliniques peuvent aller de l'animal apparemment sain jusqu'à l'animal faible, apathique, ayant des difficultés à se lever et à téter. Ces derniers peuvent présenter des anomalies du SNC, telles que des tremblements musculaires, de l'ataxie ou de la cécité. Ils meurent en général dans les quelques jours suivant leur naissance, et contribuent au « syndrome du veau faible ».

Environ 1 à 2 % des bovins sont infectés de manière permanente au sein d'un troupeau, avec de nombreux animaux virémiques qui survivent jusqu'à la maturité sexuelle et sont sélectionnés pour la reproduction. Les veaux issus de ces mères virémiques persistantes sont souvent faibles à la naissance et présentent des

troubles de croissance. Les animaux virémiques persistants présentent une source d'infection continue pour les autres animaux du troupeau. Leur identification rapide et leur retrait du troupeau sont donc indispensables. Les animaux achetés devraient être systématiquement testés en vue de montrer l'absence d'une virémie persistante de BVDV.

Les taureaux infectés ont en général un sperme de faible qualité. L'importante infectiosité du sperme diminue également la fertilité du taureau (45, 67). Tous les taureaux d'insémination naturelle ou artificielle devraient être testés afin de mettre en évidence une éventuelle infection persistante par le BVDV. Une infection persistante des testicules chez des taureaux (qui sont, par conséquent, fortement séropositifs) peut s'installer vraisemblablement à la suite d'une infection aiguë au cours de la puberté, mais cet événement est rare (59, 75). Cette situation a aussi été observée après vaccination avec un vaccin atténué (34). Les porteuses d'embryons devraient être négatives en virémie de BVDV avant la première utilisation. Les donneuses infectées de façon persistante par le BVDV présentent également une source d'infection possible, puisque les oocystes avec une *zona pellucida* interrompue sont sensibles à une infection *in vitro* (73). Cependant, une étude limitée portant sur 2 animaux infectés de façon persistante a montré que la majorité des oocystes étaient négatifs au BVDV (71). Les embryons peuvent également s'infecter suite à l'infection aiguë du donneur (3). Les produits utilisés dans les techniques de reproduction *in vitro* (sérum de bovins, cultures de cellules de bovins) sont des matériaux à risque pour l'infection par le BVDV, et devraient être testés systématiquement pour ce virus (9). En effet, des incidents récents d'introduction du virus via de telles techniques (24, 48) ont permis la mise en évidence de ces facteurs de risque. Il est fondamental que les sérums utilisés comme compléments dans les milieux de culture soient stérilisés selon les méthodes décrites dans le *Code sanitaire pour les animaux terrestres (Code terrestre)*, à l'article 4.5.5. du chapitre 4.5., « Collecte et traitement de la semence de bovins et de petits ruminants », et abordées également dans ce chapitre dans la section B.1.a. Les pays d'importation peuvent effectuer des tests supplémentaires, tels que décrits dans l'article 4.7.6. du chapitre 4.7., « Collecte et manipulation des ovules/embryons » du *Code terrestre*, afin de confirmer la stérilisation.

d) Maladie des muqueuses

Il est bien connu que les animaux virémiques persistants peuvent mourir de maladie des muqueuses par la suite (11) ; pourtant, ceci survient rarement. Il a été montré que ce syndrome est lié à la présence du biotype cytopathogène, provenant soit d'une surinfection (5, 14), soit d'une recombinaison entre des biotypes non-cytopathogènes, ou de la mutation d'un biotype persistant (50). Par conséquent, le diagnostic de confirmation de la maladie des muqueuses devrait inclure l'isolement du virus cytopathogène dans les tissus de l'animal atteint. Ce biotype est parfois isolé à partir du sang, mais est en général surtout mis en évidence dans différents tissus, comme par exemple les tissus intestinaux ou les plaques de Peyer (17). L'isolement viral est également facilement réalisé sur la rate. Celle-ci est facile à prélever et est rarement toxique pour les cultures cellulaires après préparation pour isolement viral. L'isolement à partir de tissus intestinaux est par contre parfois difficile, lorsqu'une autolyse a déjà eu lieu. Dans ce cas, des suspensions de nœuds lymphatiques intestinaux peuvent être testées. Du virus non-cytopathogène peut également être recherché, surtout sur sang ou sur les organes directement liés à la circulation sanguine. Des coupes de tissus au cryostat peuvent être colorées par immunofluorescence ou par marquage à l'immunoperoxydase afin de mettre en évidence l'antigène viral.

La maladie des muqueuses est mortelle dans tous les cas. Elle peut débiter de façon tellement fulgurante que les premiers signes cliniques observés peuvent être la mort ou l'animal moribond. Il est cependant plus habituel de voir des animaux anorexiques pendant plusieurs jours, avec un état général se dégradant et avec des signes de douleur abdominale. Ils peuvent développer une diarrhée profuse, et rapidement perdre du poids. Des érosions sont souvent remarquées dans la bouche, principalement le long de la ligne gingivale. De l'épiphora et du ptyalisme sont également observés. En général, les cas de maladie des muqueuses sont rares et sporadiques.

L'examen *post mortem* révèle des érosions des muqueuses du tractus digestif. Les plus remarquables se situent au niveau des plaques de Peyer, dans l'intestin grêle et dans les nœuds lymphatiques iléo-caecaux. À l'examen histopathologique, une destruction du tissu lymphoïde intestinal est clairement observée. La plupart des cellules des plaques de Peyer sont lysées et remplacées par des cellules inflammatoires, des débris cellulaires ou des cellules provenant de l'épithélium abîmé qui recouvrait précédemment les plaques.

L'infection aiguë par une souche de BVDV très virulente peut être cliniquement semblable à la maladie des muqueuses, ce qui peut prêter à confusion, surtout lorsque plusieurs animaux sont atteints. La maladie des muqueuses peut survenir dans des cohortes d'animaux infectés persistants lorsque les chaleurs ont été synchronisées. La différence entre l'infection aiguë et la maladie des muqueuses se fait en étudiant de près l'anamnèse, et en recherchant aussi bien des anticorps que des antigènes ou du virus chez les animaux infectés et convalescents. La séroconversion des animaux convalescents est un indicateur d'une infection aiguë, alors que deux résultats de recherche d'antigènes ou de virus positifs sur un même animal, effectués à 3 semaines d'intervalle, signent une maladie des muqueuses. En général, les animaux atteints de maladie

des muqueuses ne présentent pas d'anticorps, même si des faibles niveaux d'anticorps peuvent parfois être mis en évidence.

1. Identification de l'agent pathogène (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Toutes les méthodes de détection doivent être validées sur des animaux d'un statut connu, aussi bien des animaux non infectés que des animaux infectés, à des taux faibles et élevés de virémie. Les méthodes basées sur la liaison avec des anticorps monoclonaux ou sur la mise en évidence d'acide nucléique doivent détecter l'ensemble des virus BVDV, aussi variables qu'ils soient du point de vue antigénique ou génétique. Il existe deux Laboratoires de référence pour le BVDV désignés par l'OIE (cf. Tableau de la 3^e partie du présent *Manuel terrestre*). Les Laboratoires de référence pour la peste porcine classique peuvent également être contactés lors de besoin de conseils.

a) Isolement viral

Le virus peut être isolé dans un grand nombre de cultures monocouches de cellules de bovins (par ex. rein, poumon, testicules ou de cornet nasaux). La multiplication des deux biotypes est en général satisfaisante. Le BVDV est un contaminant fréquent des tissus frais de bovins, et l'absence de ce virus adventice doit être auparavant prouvée dans les cultures cellulaires par les tests habituels (8, 28). Les cultures de première ou seconde explantation peuvent être congelées dans de l'azote liquide en tant que suspensions cellulaires. Les tests peuvent ensuite être effectués sur une série de passages, ou elles peuvent être repiquées avec d'autres cellules sensibles au virus avant d'être utilisées en routine. Ce genre de problèmes peut être évité en utilisant des lignées cellulaires continues, qui peuvent être obtenues certifiées indemnes de BVDV (8).

Le sérum fœtal bovin sélectionné pour l'utilisation en culture cellulaire doit être indemne de virus, et tout aussi important, également d'anticorps neutralisant le BVDV (28). Le traitement par la chaleur (56 °C pendant 30 à 45 min) n'est pas adéquat pour détruire le BVDV infectant le sérum ; l'irradiation à 25 kiloGrays (2,5 Mrad) est une méthode plus probante. Les lots commerciaux de sérum fœtal bovin sont en général positifs à la PCR, même après l'inactivation virale par irradiation. Lorsque la possibilité se présente, le sérum fœtal bovin peut être remplacé par du sérum de cheval, même si en général ce dernier a souvent une moins bonne capacité à promouvoir la croissance cellulaire.

Les cellules mononucléées sanguines, le sang complet, les leucocytes lavés ou le sérum conviennent pour l'isolement du virus à partir d'échantillons prélevés sur animal vivant. Les anticorps maternels peuvent interférer avec l'isolement à partir de sérum de jeune veau. Les suspensions tissulaires de cadavres doivent être préparées selon les méthodes de référence. Le sperme peut également être analysé, mais il est préférable d'effectuer le test chez les taureaux d'insémination sur un échantillon sanguin s'il est possible de l'obtenir. Un cas de transmission persistante atypique de BVDV par le sperme d'un taureau non virémique a été décrit (75). Le sperme frais est cytotoxique et doit être dilué dans un milieu de culture. Le sperme dilué peut en général être directement inoculé à une culture cellulaire monocouche, mais peut parfois être cytotoxique malgré tout. Pour ces raisons, lors de l'incubation, il est important de surveiller l'état des cellules par examen microscopique à intervalles réguliers.

Il y a beaucoup de variabilité dans les procédures utilisées pour isoler le virus. Elles devraient toutes être optimisées avec une préparation virale de référence, afin d'obtenir un maximum de sensibilité de détection. Ceci peut comprendre un ou plusieurs passages *in vitro*. Les méthodes conventionnelles d'isolement viral sont utilisées, avec par la suite une phase finale de marquage immunologique (par fluorescence ou par enzymes) pour détecter la croissance du virus non-cytopathogène. Les cultures en puits peuvent inclure des lamelles couvre-objets sur lesquelles les cellules peuvent être fixées et marquées directement. Des exemples sont donnés ci-dessous.

- **Méthode de détection virale sur échantillon de sérum pour tests à grande échelle, par marquage par immunoperoxydase sur microplaque (54).**

- Placer 10 µl de sérum dans chacun des 4 puits d'une culture tissulaire sur une plaque de 96 puits. Ceci est répété pour chaque échantillon. Des témoins positifs et négatifs sont inclus ;
- Ajouter 100 µl d'une suspension cellulaire de 150 000 cellules/ml dans un milieu sans sérum fœtal bovin (FCS) dans tous les puits. *NB* : l'échantillon agit en lui-même comme promoteur de la croissance cellulaire. Pour tester d'autres échantillons que du sérum, utiliser un milieu à 10 % de FCS, exempt d'anticorps dirigés contre les pestivirus des ruminants ;
- La plaque est incubée à 37 °C pendant 4 jours, soit dans une atmosphère à 5 % de CO₂, soit en scellant le couvercle sur la plaque de puits ;
- Examiner chaque puits au microscope afin de mettre en évidence un effet cytopathogène (ECP), ou des signes de cytotoxicité ;

- v) Vider délicatement la plaque et la rincer dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) ;
- vi) Fixer la plaque de la façon suivante : la plonger dans un bain d'acétone à 20 % dans du PBS. La vider immédiatement et la transférer à un nouveau bain d'acétone 20 % / PBS pendant 10 min. Bien égoutter, et éliminer un maximum de liquide en tapotant et séchant. Laisser bien sécher la plaque pendant au moins 3 h entre 25 et 30 °C (par ex. en la chauffant au moyen d'une lampe). *NB* : le séchage fait partie du procédé de fixation.

Des méthodes alternatives de fixation se basent sur une fixation au paraformaldéhyde ou à la chaleur (cf. Chapitre 2.8.3., Peste porcine classique, Section B.2.b.viii) ;

- vii) Rincer les cellules fixées et ajouter du PBS à tous les puits ;
- viii) Égoutter les puits et ajouter les anticorps anti-BVDV (50 µl) à tous les puits à une dilution prédéterminée dans du PBS, contenant 1 % de Tween 80 (PBST) et 5 % de sérum équin (le sérum équin peut être ajouté pour réduire le risque de coloration non spécifique). Incuber la plaque à 37 °C pendant 15 min ;
- ix) Vider la plaque et la laver 3 fois au PBST ;
- x) Égoutter la plaque et ajouter le sérum anti-espèces adéquat conjugué aux peroxydases à une dilution prédéterminée dans du PBST (50 µl par puits) pendant 15 min à 37 °C ;
- xi) Vider la plaque et la laver 3 fois au PBST.
- xii) Rincer la plaque dans de l'eau distillée. Vider tout le liquide de la plaque ;
- xiii) Ajouter du substrat de peroxyde d'hydrogène fraîchement préparé avec un chromogène adéquat, c'est-à-dire du 3-amino-9-éthyl carbazole (AEC). La solution de stock est : AEC (0,1 g) dissous dans du diméthyl formamide (15 ml). Pour l'utilisation, la solution de stock (0,3 ml) est ajoutée à 0,05 M d'acétate tamponné (5 ml, pH 5,0), et ensuite à 30 % de H₂O₂ (5 µl). Un substrat alternatif peut être constitué : 9 mg de tétrahydrochlorure de diaminobenzidine et 6 mg de perborate tétrahydrate de sodium dissous dans 15 ml de PBS. Même si la coloration n'est pas aussi intense, ces produits ont l'avantage de pouvoir être transportés en avion ;
- xiv) Examiner la plaque au microscope. Les cellules infectées par du virus présenteront une coloration cytoplasmique brun rouge.

- **Méthode de détection sur culture de cellules pour des échantillons de tissus, de leucocytes ou de sperme**

NB : Cette méthode peut être adaptée à des plaques de 24 puits.

- i) Broyer les échantillons de tissus et suspendre 10 % dans du milieu de culture. Centrifuger pour éliminer les débris. Diluer à 1/10 le sperme frais dans du milieu de culture ;
- ii) Inoculer les puits (avec des lamelles couvre-objets) de tapis cellulaires monocouches de cellules bovines fraîchement confluentes ou presque confluentes avec 0,1 ml de suspension. Incuber les cellules pendant 1 h à 37 °C ;
- iii) Laver la culture avec 1 ml de milieu, jeter celui-ci puis ajouter 1 ml de milieu de culture ;
- iv) Incuber pendant 4 à 5 jours à 37 °C, puis l'examiner au microscope, afin de mettre en évidence des ECP ou des signes cytotoxiques ;
- v) La culture peut soit être congelée puis décongelée afin de la passer dans des cultures fraîches, soit être fixée dans l'acétone et colorée en immunofluorescence directe avec du conjugué dirigé contre le BVDV, après avoir ôté la lamelle couvre-objet. Dans ce dernier cas, il faut vérifier au microscope à immunofluorescence la présence de fluorescence cytoplasmique caractéristique des pestivirus.

D'autre part, les cultures peuvent être récoltées après congélation/décongélation et passées sur des plaques de microtitrage afin d'être cultivées et colorées par la méthode de l'immunoperoxydase (voir ci-dessus, section sur la méthode de coloration par immunoperoxydase sur microplaque dans le criblage de masse de sérums bovins) ou par la méthode d'immunofluorescence décrite dans ce chapitre.

b) Épreuve immuno-enzymatique (ELISA) pour la détection d'antigènes

Plusieurs méthodes ELISA ont été publiées pour la détection d'antigènes (par ex. réf. 29) et un certain nombre de kits de diagnostic commerciaux sont disponibles. La plupart sont basées sur le principe de l'ELISA sandwich, avec un anticorps de capture lié à la phase solide, et un anticorps de détection conjugué au système de détection, tel que la peroxydase. Des systèmes aussi bien mono- que polyclonaux sont décrits. Le test convient pour la détection d'animaux infectés de façon persistante, et mesure habituellement

l'antigène BVDV dans les lysats de leucocytes sanguins (NS2-3 ou E^{RNS}). La nouvelle génération d'ELISA de capture (E^{RNS} capture ELISA) est capable de détecter les antigènes du BVDV dans le sang ainsi que dans les échantillons de plasma et sérum. La meilleure méthode a une sensibilité semblable à celle de l'isolement viral, et peut être préférée dans les rares cas d'infection persistante associée à une séropositivité. En raison de la virémie transitoire, l'ELISA de capture est moins utile dans la détection du virus lors d'infections aiguës par le BVDV.

L'ELISA NS2-3 peut posséder une sensibilité plus faible chez les jeunes veaux qui ont ingéré du colostrum en raison de la présence d'anticorps anti-BVDV maternels. La méthode de transcription inverse couplée à une PCR (RT-PCR) est probablement la méthode la plus sensible dans ce cas, même si l'ELISA E^{RNS} a également montré une bonne sensibilité et un test sûr, en particulier quand l'échantillon a été prélevé par entaille à l'oreille (18).

c) Immunohistochimie

Les méthodes basées sur un marquage enzymatique sont utiles dans la détection des antigènes du BVDV au niveau de coupes de tissus (77), principalement lorsque les anticorps monoclonaux (AcM) adéquats sont disponibles. Il est important que le réactif et les procédures suivies soient pleinement validés, et que toute possibilité de réactivité non spécifique puisse être éliminée. Dans le cas de bovins infectés de façon persistante, à peu près n'importe quel tissu peut être utilisé, mais les meilleurs résultats sont obtenus avec les nœuds lymphatiques, la glande thyroïde, la peau, le cerveau, la caillette et le placenta. Les biopsies de peau, telles que les échantillons obtenus par entaille à l'oreille, se révèlent utiles dans le diagnostic *in vivo* d'animaux infectés de façon persistante par le BVDV (17).

d) Détection d'acides nucléiques

La méthode de RT-PCR peut être adaptée à la détection d'ARN viral du BVDV dans un objectif de diagnostic (10, 36, 44, 46). Cette méthode peut être particulièrement intéressante lorsqu'une infection à faible titre viral est suspectée, par exemple dans le cas de criblage de masse de lots de sérums fœtal bovin (FCS) ou de produits biologiques tels que des vaccins (38). La prudence est de mise lors de l'interprétation des résultats, puisque la détection de l'ARN viral n'implique pas forcément que le virus infectieux soit présent. Une PCR multiplex peut être utilisée pour amplifier et typer le virus à partir d'une culture cellulaire, ou directement à partir d'échantillons sanguins, en utilisant des produits de PCR de différentes tailles (33). Des technologies plus récentes incorporent l'utilisation de sondes d'ADN marquée à la fluorescéine, ce qui confirme l'identité du produit de PCR, permet la lecture automatisée et permet une différenciation entre pestivirus en temps réel (53). La recherche virale par PCR après inoculation de cultures cellulaires devrait être évitée, puisque le résultat pourrait être faussement positif, si du sérum fœtal bovin du commerce contaminé par des pestivirus de ruminant a été utilisé dans le milieu de culture. Les amorces devraient être choisies dans les régions conservées du génome, telle qu'idéalement la région non codante 5' ou le gène p80 (dans NS3). Les tests moléculaires peuvent favoriser la contamination s'ils sont mis dans des mains non expérimentées. C'est pour cela que des précautions strictes devraient être prises afin d'éviter la contamination par l'ADN dans le système de tests, et que des contrôles rigoureux doivent être effectués (cf. 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 technique de RT-PCR est également suffisamment sensible pour rendre possible la détection d'animaux infectés de façon persistante parmi des vaches laitières dans des troupeaux jusqu'à 100 animaux ou plus, en testant les cellules somatiques dans le lait de citerne (25 66). Un résultat positif indique qu'au moins un animal infecté de façon persistante est présent dans le troupeau laitier. Des isollements viraux ou des tests de détection d'antigènes sont ensuite nécessaires afin d'identifier l'individu positif.

L'acide nucléique dans les tissus peut être détecté par l'hybridation *in situ* avec des ribosondes liées à des enzymes (22). Il s'agit d'une technique sensible qui peut être utilisée sur du tissu fixé au formol et en blocs de paraffine, ce qui permet une analyse rétrospective. L'extraction de l'acide nucléique et la réalisation d'une RT-PCR pour de tels échantillons ont été décrites et elles permettent aussi des analyses phylogénétiques (2).

2. Épreuves sérologiques

Les anticorps contre le BVDV peuvent être détectés dans du sérum bovin par la technique de séroneutralisation virale normalisée (SN) ou par ELISA, en utilisant une ou plusieurs des méthodes publiées (27, 40, 43, 63). Des sérums témoins positifs et négatifs doivent être inclus dans le chaque test. Le test devrait donner des résultats situés dans des limites préalablement définies, pour pouvoir être considéré comme valable. L'ELISA de recherche d'anticorps dans le lait de citerne peut donner une indication précieuse sur le statut BVD d'un troupeau (58). Une valeur élevée (située à 1,0 ou plus d'unités d'absorbance) indique une probabilité importante que le troupeau ait été exposé au BVDV dans un passé proche, et que vraisemblablement un ou plusieurs animaux virémiques

persistants sont présents dans le troupeau. Au contraire, une très faible valeur ou une valeur négative ($\leq 0,2$) indique que la présence d'animaux virémiques persistants est peu probable. Une classification plus fine a été proposée pour des valeurs intermédiaires, mais elle dépend fortement du système d'élevage. Dans au moins une étude, les valeurs d'ELISA se sont révélées être des indicateurs non fiables de la présence d'animaux virémiques persistants dans les fermes en raison de systèmes d'élevage différents (78), et aussi de la présence d'antigène viral dans les laits de mélange, ce qui peut interférer avec le test de dépistage des anticorps (60). La détermination d'un statut d'anticorps d'un faible nombre d'animaux du troupeau de renouvellement (9 à 18 mois) a également été proposée comme indicateur d'une exposition récente au BVDV (39), mais il est également dépendant de degré de contact entre les différents groupes d'âges du troupeau. Des « spot tests » rapides peuvent être utilisés lors d'un criblage préliminaire dans un processus de contrôle et d'éradication du BVD (49).

a) Test de séroneutralisation virale

La plupart des laboratoires utilisent des souches virales hautement cytopathogènes dans les tests de SN, pour des raisons de facilité de lecture du test. Cependant, des techniques de mise en évidence par méthodes immunologiques sont désormais disponibles, et permettent la simple détection de la croissance ou la neutralisation de souches non-cytopathogènes lorsqu'il est considéré opportun de le faire. Aucune souche n'est susceptible d'être utilisable en toutes circonstances, mais, dans la pratique, il faut sélectionner une souche qui permette de détecter le plus grand nombre de réactions sérologiques possible dans les troupeaux bovins de la région. Deux souches cytopathogènes très fréquemment utilisées sont « l'Oregon C24V » et la « NADL ». Les faibles taux d'anticorps contre le BVDV de type 2 pourraient ne pas être détectés par un test de SN utilisant une souche virale de type 1 et inversement (32). Il est donc important d'utiliser du BVDV de type 1 ainsi que de type 2 dans les tests, et pas seulement celui que la personne responsable du diagnostic pense être présent, puisque cette démarche augmenterait le taux de sous diagnostics.

Un protocole détaillé d'un test de séroneutralisation est décrit ci-dessous (27) :

- i) Les sérums utilisés pour le test sont inactivés par traitement à la chaleur à 56 °C pendant 30 min ;
- ii) Des dilutions de 2 fois des sérums utilisés pour le test sont réalisées à partir d'une dilution initiale de 1/5. Les dilutions se font dans une plaque de culture cellulaire 96 puits à fond plat, en utilisant le milieu de culture cellulaire comme liquide diluant. Pour chaque échantillon, utiliser 2 ou 4 puits de chaque dilution, en fonction du degré de précision attendu. Il faut également tester les témoins positifs et négatifs ;
- iii) Un volume équivalent (par ex. 50 µl) d'une souche cytopathogène de BVDV, contenant 100 DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) est ajouté à chaque puits. Un titrage de contrôle du virus est réalisé dans un certain nombre de puits réservés à cet effet afin de vérifier l'activité du virus (limites d'acceptation 30– 421 DICT₅₀) ;
- iv) La plaque est incubée à 37 °C pendant 1 h ;
- v) Un flacon de cellules adéquates (par ex. de cornets nasaux bovins, de testicules bovins) sont trypsinisées et la concentration cellulaire est ajustée à 3×10^5 /ml. 50 µl de la suspension cellulaire sont ajoutés à chaque puits de la plaque de titrage ;
- vi) La plaque est incubée à 37 °C pendant 4 à 5 jours, soit dans une atmosphère à 5 % CO₂, soit après avoir scellé le couvercle ;
- vii) Les puits sont examinés au microscope afin d'identifier l'ECP. Le titre de SN pour chaque sérum est la dilution à laquelle le virus est neutralisé dans 50 % des puits. Cette valeur peut être calculée par la méthode de Spearman-Kärber. Un animal séronégatif ne présentera pas de neutralisation à la plus faible dilution (1/5), ce qui équivaut à une dilution finale de 1/10.

b) Épreuve immuno-enzymatique

On peut utiliser aussi bien la méthode indirecte que celle de blocage (40, 43, 63). Un certain nombre de kits commerciaux sont disponibles. La majeure difficulté dans la mise au point de ces tests réside dans la préparation d'un antigène viral suffisamment efficace. Le virus doit se multiplier dans des conditions optimales de culture cellulaire, en utilisant un type de cellules très efficaces en ce sens. Aucun sérum utilisé dans le milieu ne peut inhiber la croissance du BVDV. Le moment optimal pour la récolte devrait être déterminé de façon expérimentale dans un système de cultures individuelles. Le virus peut être concentré et purifié par centrifugation en gradient de densité. Un antigène puissant peut être préparé de façon alternative en traitant des cultures de cellules infectées avec des détergents tels que le Nonidet P40, N-décanoyl-N-méthylglucamine (Mega 10), Triton X-100 ou 1-octyl-béta-D-glucopyranoside (OGP). Certaines personnes ont utilisé des cellules entières fixées comme antigène. Dans le futur, l'utilisation d'antigènes artificiels, créés à partir de l'expression de gènes viraux dans un système bactérien ou eucaryote, augmentera (72). Ce genre de systèmes devrait être validé par un dosage du sérum spécifique pour un grand nombre de souches

virales différentes. Dans le futur, cette technologie devrait rendre possible la production d'épreuves sérologiques complémentaires à des sous-unités, ou des vaccins marqués, et rendre possible la différenciation entre les bovins infectés par une souche vaccinale ou sauvage.

Un exemple de protocole d'ELISA indirect est décrit ci-dessous (27).

- i) Il est conseillé d'utiliser des cultures en flacons roulants de cellules secondaires de testicules de veau, avec une haute multiplicité d'infection (environ un) pour les inoculer avec la souche BVDV Oregon C24V, et les recouvrir de milieu sans sérum, et incubé à 37 °C pendant 24 h ;
- ii) Les cellules sont détachées et centrifugées. Le milieu surnageant est éliminé. Le culot est traité avec 2 volumes de 2 % OGP dans du PBS pendant 15 min à 4 °C, et centrifugé pour ôter les débris cellulaires. L'antigène surnageant est stocké en petits aliquots à -70 °C, ou lyophilisé. Des cellules non infectées sont traitées de la même façon, afin de former un antigène témoin ;
- iii) L'antigène est dilué dans une dilution prédéterminée de 0,05 M tampon bicarbonate, pH 9,6. Une rangée sur deux d'une plaque de microtitrage pour ELISA est recouverte de virus et de témoin, et la plaque est laissée à 4 °C pendant une nuit. Ensuite, les plaques sont lavées dans du PBS 0,05 % Tween 20 ou Tween 80 (PBST) avant de les utiliser pour le test ;
- iv) Les sérums à tester sont dilués à 1/50 dans du diluant pour sérum (0,5 M NaCl ; 0,01 M tampon phosphate ; 0,05 % Tween 20 ; 0,001 M éthylène diamine acide tétra-acétique ; 1 % polyvinyle pyrrolidone, pH 7,2) et ajouté aux puits recouverts de virus et de contrôle pendant 1 h à 37 °C. Les plaques sont lavées ensuite 5 fois dans du PBST ;
- v) Des IgG anti-bovin de lapins conjugués à de la peroxydase sont ajoutés à une concentration prédéterminée (dilué dans du diluant pour sérum) pendant 1 h à 37 °C. Ensuite, les plaques sont à nouveau lavées 5 fois au PBST ;
- vi) Un substrat enzymatique adéquat, tel que du peroxyde d'hydrogène/tétraméthyl benzidine est ajouté. Après apparition de la couleur, la réaction est arrêtée avec de l'acide sulfurique et l'absorbance est lue sur un lecteur de plaques ELISA. La valeur obtenue avec l'antigène témoin est soustraite de la réaction du test, afin d'obtenir une valeur nette d'absorbance pour chaque sérum ;
- vii) Il est recommandé de convertir les valeurs d'absorbance nette à un ratio échantillon/positif (ou pourcentage de positivité) en divisant l'absorbance nette par l'absorbance nette d'un étalon positif, possédant une absorbance nette de 1,0. Cette procédure de normalisation mène à l'obtention de résultats plus consistants et reproductibles.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

La voie de transmission du BVDV probablement la plus importante dans les fermes est l'oropharynx et le tractus respiratoire. La protection contre la dissémination serait donc bénéfique dans le contrôle de la maladie, principalement chez les jeunes animaux. La formulation d'un vaccin protégeant contre les infections fœtales est également nécessaire dans la prévention d'un grand nombre de syndromes liés à l'infection *in utero* (13).

Un vaccin de référence pour la protection contre l'infection n'a pas encore été développé, mais un certain nombre de préparations commerciales sont disponibles, par exemple en Europe et en Amérique du Nord. Habituellement, les vaccins BVD étaient basés sur une souche cytopathogène, et se différenciaient en deux classes : les virus vivants atténués et les virus inactivés.

Même si les virus vivants atténués sont disponibles dans certains pays, ils devraient être utilisés sous surveillance vétérinaire rapprochée, puisqu'une souche cytopathogène peut provoquer la maladie des muqueuses en cas de surinfection d'un animal virémique persistant. D'autre part, le composant non-cytopathogène peut traverser la barrière placentaire chez les femelles gestantes, et ainsi infecter le fœtus comme décrit dans la Section B.b. Le vaccin à virus vivant peut également agir comme immunosuppresseur et précipiter d'autres infections. D'un autre côté, les vaccins à virus vivants atténués peuvent ne nécessiter qu'une seule dose. En principe, les vaccins contenant du virus inactivé, sont sûrs à l'utilisation, mais afin d'obtenir des niveaux de protection immunitaire suffisants, un rappel de vaccination est souvent nécessaire, ce qui peut constituer un inconvénient. Un protocole de vaccination combinée, en utilisant d'abord du virus inactivé et ensuite de l'atténué peut réduire le risque de réactions non désirées à la souche vivante atténuée (28).

Des vaccins expérimentaux inactivés, basés sur l'expression de gène de la glycoprotéine virale E2 du BVD dans un système de baculovirus, ont été décrits. Ils offrent des perspectives futures pour la fabrication de vaccins marqués dans le cadre d'épreuves sérologiques complémentaires (15). Cependant, il convient de garder à l'esprit

que de tels vaccins pour la peste porcine classique qui est très proche ne se sont pas révélés efficaces, vraisemblablement en raison de leur incapacité à induire une forte réponse immunitaire de type cellulaire.

Le BVDV est un danger biologique particulièrement important dans la fabrication de réactifs de diagnostic d'autres maladies, à cause de la fréquence élevée de contamination de lots de sérum fœtal bovin utilisé comme supplément de milieu de culture (38). Il faut prêter une attention toute particulière aux sérums destinés à être administrés à des animaux, ou utilisés comme supplément de croissance dans le transfert d'embryons ou les fécondations *in vitro*. Le sérum utilisé dans ces situations doit être traité de telle façon à en assurer la stérilité. Il est recommandé d'effectuer des tests de post-traitement, tels que détaillés dans le Chapitre 1.1.9, « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques », afin de s'assurer que le sérum est indemne de BVDV.

Des lignes directrices pour la production de vaccins vétérinaires sont données dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Elles ont pour objectif d'être générales, et peuvent être complétées par des exigences nationales et régionales.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Le vaccin idéal devrait contenir une (ou des) souche(s) de virus pour lequel la protection contre la grande diversité antigénique du BVDV a été démontrée. Les caractéristiques antigéniques de souches individuelles peuvent être appréciées en les testant avec des ensembles d'anticorps monoclonaux (64). Les virus multipliés devraient être typés par séquençage (68).

L'émergence du génotype 2 du BVD a posé des questions en ce qui concerne le degré de protection contre le virus de type 2 conféré par les vaccins de type 1. Une étude *in vitro* de séroneutralisation de sérums induits par la vaccination a révélé une réactivité très large de plusieurs souches européennes et américaines, y compris les souches de type 2 (37). D'autres travaux ont montré que le vaccin dérivé d'un seul génotype peut donner une protection contre l'autre génotype (19, 21, 52). Cependant, l'efficacité de la vaccination de n'importe quel génotype, et ce particulièrement avec du vaccin inactivé, dans la prévention du passage placentaire est moins prévisible, puisque la virémie est rarement empêchée totalement.

Des isolats de virus cytopathogène sont souvent présents en mélange avec le biotype non-cytopathogène. La séparation et la purification des deux biotypes depuis une culture initialement mixte nécessitent 3 cycles de purification par la méthode de dilution limite, ou une méthode de purification en 3 étapes par la méthode des plages du virus cytopathogène. La pureté du virus cytopathogène devrait être confirmée par au moins un passage supplémentaire en dilution limite. Lorsque les isolats sont clonés, ils devraient être confirmés par une coloration directe ou indirecte avec des anticorps spécifiques liés à de la fluorescéine ou à une enzyme.

b) Méthode de culture

Les deux biotypes se multiplient dans une variété de cultures cellulaires d'origine bovine. Les procédures habituelles peuvent être utilisées, avec une prévision de récolte du virus non-cytopathogène en 5 à 7 jours, et du virus cytopathogène en 2 à 4 jours. Les détails d'une multiplication optimale dépendent d'un grand nombre de facteurs, y compris de la culture cellulaire et de l'isolat utilisé, ainsi que du taux d'infection initial utilisé (42).

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Tous les vaccins devraient être soumis aux tests de référence en ce qui concerne leur sécurité et leur efficacité. Il est essentiel de s'assurer que les cultures cellulaires et le sérum fœtal bovin utilisé dans le milieu de culture cellulaire sont exempts de contamination accidentelle par le BVDV ou d'anticorps (décrit dans la section B), ou d'autres microorganismes. Les vaccins à virus vivants atténués doivent soit être démontrés comme sûrs pour les vaches gestantes (c'est à dire la non transmission au fœtus), soit être accompagnés d'une notice afin de prévenir l'utilisateur de ne pas vacciner les animaux en gestation. Les vaccins à virus vivants contenant des souches cytopathogènes devraient être accompagnés d'un avertissement adéquat concernant le risque de développer la maladie des muqueuses chez les bovins infectés de façon persistante.

Les tests d'efficacité des vaccins contre le BVDV chez les animaux non gestants sont limités à cause de la difficulté à établir un modèle de challenge satisfaisant. Les tests devraient comprendre au moins la démonstration de la séroconversion suite à la vaccination, la réduction de la transmission virale après inoculation des animaux vaccinés, et la diminution des paramètres cliniques mesurables tels que la température rectale et la leucopénie (4, 13, 42). L'efficacité des vaccins utilisés chez les bovins de reproduction devrait également être évaluée dans le cadre de la réduction et idéalement de la prévention

complète de la transmission transplacentaire. Dans ce cas, une étude valable pourrait être établie par inoculation intranasale de virus non-cytopathogènes à des vaches gestantes de moins de 90 jours (13). En général, ce genre d'épreuve reproduira fidèlement la virémie persistante chez les veaux issus de vaches non immunisées.

2. Méthode de fabrication

Il n'y a pas de méthode de référence pour produire du vaccin BVD, mais toutes les techniques habituelles de cultures cellulaires stationnaires, en flacons roulants ou en suspension peuvent être utilisées. Les vaccins à virus inactivés peuvent être préparés par les méthodes conventionnelles, telles que l'inactivation par de l'éthylènimine binaire ou de la bêta-propiolactone (42, 61). Un grand nombre d'adjuvants peuvent être utilisés (42, 57).

3. Contrôles en cours de fabrication

Les cultures doivent être inspectées régulièrement, afin de s'assurer de l'absence de contamination, et de vérifier la bonne santé des cultures et le développement ou l'absence d'ECP selon les cas.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité pour l'absence de contamination par du matériel biologique sont décrits dans le Chapitre 1.1.9.

b) Innocuité

Il est essentiel d'éliminer toute l'infectivité durant la préparation des vaccins à virus inactivés, et les échantillons devraient être soumis à plusieurs passages en culture de cellules afin d'assurer l'absence de BVDV vivant. Il peut également s'avérer nécessaire de démontrer l'absence d'agents proscrits (avant l'inactivation), avant d'autoriser l'utilisation du vaccin.

c) Activité

Idéalement, l'activité du vaccin devrait être déterminée par l'inoculation à des veaux séronégatifs et vironégatifs, suivie d'un contrôle de leur réponse en anticorps. Cependant, cette méthode est beaucoup trop coûteuse pour le contrôle de lots. Le contenu en antigènes peut être vérifié par ELISA et ajusté pour atteindre le niveau requis pour un vaccin en particulier (4, 51). Des protocoles normalisés de mesure applicables à tous les vaccins n'existent pas. Les lots de vaccins à virus atténués peuvent être soumis au titrage de leur infectivité.

d) Durée de l'immunité

Il existe peu de données publiées concernant la durée de la persistance des anticorps suite à la vaccination avec des produits commerciaux. Les protocoles d'utilisation recommandent en général une primo-vaccination en deux injections, avec un rappel annuel. Seules des données limitées sont disponibles concernant le lien entre le taux d'anticorps et la protection contre les infections respiratoires (7, 41) et *in utero* (13).

e) Stabilité

Il n'existe pas de marche à suivre fixée pour vérifier la stabilité des vaccins BVD, mais il peut être considéré que les vaccins à virus atténués (contenant des virus lyophilisés) restent actifs pendant au moins 1 an, s'ils sont conservés à 4 °C. Des températures inférieures pourraient prolonger la durée de vie autant des vaccins à virus inactivés que des vaccins à virus atténués, mais certains adjuvants de vaccins à virus inactivés peuvent empêcher l'application d'une telle méthode.

f) Précautions d'emploi et mise en garde

Le BVDV n'est pas considéré comme un danger biologique pour la santé humaine. Les bonnes pratiques microbiologiques habituelles devraient convenir pour la manipulation du virus en laboratoire.

5. Contrôles du produit fini

a) Tests d'innocuité

La sécurité du produit final, aussi bien pour les vaccins à virus inactivés qu'atténués, devrait être mesurée sur des veaux sensibles, afin de vérifier l'absence de réactions locales suite à l'administration ; ainsi que sur des vaches gestantes, afin de vérifier les effets sur le fœtus. Les tests pour les lots individuels sont décrits dans la Section C.4.b.

b) Tests d'activité antigénique

Il doit être démontré que les vaccins contre le BVDV induisent une réaction immune adéquate, telle que décrite dans la Section C.4.c., lorsqu'ils sont utilisés selon la notice. Des épreuves *in vitro* (Section C.4.c.) peuvent être utilisées comme contrôle de lots individuels.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BAKER J.C. (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet. Clin. North. Am. – Food Animal Practice*, **11**, 425–445.
2. BHUDEVI B. & WEINSTOCK D. (2003). Detection of bovine viral diarrhea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman). *J. Virol. Methods*, **109**, 25–30.
3. BIELANSKI A., SAPP T. & LUTZE WALLACE C. (1998). Association of bovine embryos produced by *in vitro* fertilization with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhea virus type II. *Theriogenol.*, **49**, 1231–1238.
4. BOLIN S.R. (1993). Immunogens of bovine viral diarrhea virus. *Vet. Microbiol.*, **37**, 263–271.
5. BOLIN S.R. (1995). The pathogenesis of mucosal disease. *Vet. Clin. North. Am.*, **11**, 489–500.
6. BOLIN S.R. & RIDPATH J.F. (1992). Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. *Am. J. Vet. Res.*, **53**, 2157–2163.
7. BOLIN S.R. & RIDPATH J.F. (1995). Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.*, **56**, 755–759.
8. BOLIN S.R., RIDPATH J.F., BLACK J., MACY M. & ROBLIN R. (1994). Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhea virus. *J. Virol. Methods*, **48**, 211–221.
9. BOOTH P.J., STEVENS D.A., COLLINS M.E. & BROWNLIE J. (1995). Detection of bovine viral diarrhoea virus antigen and RNA in oviduct and granulosa cells of persistently infected cattle. *J. Reprod. Fertil.*, **105**, 17–24.
10. BROCK K.V. (1995). Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet. Clin. North. Am.*, **11**, 549–561.
11. BROWNLIE J. (1985). Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease complex in cattle. *In Practice*, **7**, 195–202.
12. BROWNLIE J. (1990). The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **9**, 43–59.
13. BROWNLIE J., CLARKE M.C., HOOPER L.B. & BELL G.D. (1995). Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. *Vet. Rec.*, **137**, 58–62.
14. BROWNLIE J., CLARKE M.C. & HOWARD C.J. (1984). Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.*, **114**, 535–536.
15. BRUSCHKE C.M., VAN OIRSCHOT J.M. & VAN RIJN P.A. (1999). An experimental multivalent bovine virus diarrhea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep. *Vaccine*, **17**, 1983–1991.

16. CARMAN S., VAN DREUMEL T., RIDPATH J., HAZLETT M., ALVES D., DUBOVI E., TREMBLAY R., BOLIN S., GODKIN A. & ANDERSON N. (1998). Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993–1995. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 27–35.
17. CLARKE M.C., BROWNLIE J. & HOWARD C.J. (1987). Isolation of cytopathic and non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus from tissues of infected animals. *In: Pestivirus Infections of Ruminants*, Harkness J.W., ed. Commission of the European Communities, Brussels, Belgium, EUR10238, 3–10.
18. CORNISH T.E., VAN OLPHEM A.L., CAVENDER J.L., EDWARDS J.M., JAEGER P.T., VIEYRA L.L., WOODARD L.F., MILLER D.R. & O'TOOLE D. (2005). Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 110–117.
19. CORTESE V.S., WEST K.H., HASSARD L.E., CARMAN S. & ELLIS J.A. (1998). Clinical and immunologic responses of vaccinated and unvaccinated calves to infection with a virulent type-II isolate of bovine viral diarrhea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **213**, 1312.
20. DAVID G.P., CRAWSHAW T. R., GUNNING R.F., HIBBERD R.C., LLOYD G.M. & MARSH P.R. (1994). Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Vet. Rec.*, **134**, 468–472.
21. DEAN H.J. & LEYH R. (1999). Cross-protective efficacy of a bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1 vaccine against BVDV type 2 challenge. *Vaccine*, **17**, 1117–1124.
22. DESPORT M., COLLINS M.E. & BROWNLIE J. (1994). Detection of bovine virus diarrhoea virus RNA by *in situ* hybridisation with digoxigenin-labelled riboprobes. *Intervirology*, **37**, 269–276.
23. DONIS R.O. (1995). Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *Vet. Clin. North. Am.*, **11**, 393–423.
24. DREW T.W., SANDVIK T., WAKELEY P., JONES T. & HOWARD P. (2002). BVD virus genotype 2 detected in British cattle. *Vet. Rec.*, **151**, 551.
25. DREW T.W., YAPP F. & PATON D.J. (1999). The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Vet. Microbiol.*, **64**, 145–154.
26. DUFFELL S.J. & HARKNESS J.W. (1985). Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.*, **117**, 240–245.
27. EDWARDS S. (1990). The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **9**, 115–130.
28. EDWARDS S. (1993). Bovine viral diarrhea virus. *In: Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures*, Doyle A., Griffiths J.B. & Newell D.G., eds. John Wiley & Sons, Chichester, UK. Module 7B:5, 1–8.
29. ENTRICAN G., DAND A. & NETTLETON P.F. (1995). A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. *Vet. Microbiol.*, **43**, 65–74.
30. FRAY M.D., MANN G.E., BLEACH E.C.L., KNIGHT P.G., CLARKE M.C. & CHARLESTON B. (2002). Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Reproduction*, **123**, 281–289.
31. FREY H.R. & EICKEN K. (1995). Untersuchungen über die Wirksamkeit einer inaktivierten BVD-Vakzine sur Erhöhung der Sicherheit einer BVD-Lebendvakzine. *Tierarztl. Umsch.*, **50**, 86–93.
32. FULTON R.W., SALIKI J.T., BURGE L.J., DOFFAY J.M., BOLIN S.R., MAES R.K., BAKER J.C. & FREY M.L. (1997). Neutralizing antibodies to type-1 and type-2 bovine viral diarrhea viruses – detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **4**, 380–383.
33. GILBERT S.A., BURTON K.M., PRINS S.E. & DEREGT D. (1999). Typing of bovine viral diarrhea viruses directly from blood of persistently infected cattle by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 2020–2023.
34. GIVENS M.D., RIDDELL K.P., WALZ P.H., RHOADES J., HARLAND R., ZHANG Y., GALIK P.K., BRODERSEN B.W., COCHRAN A.M., BROCK K.V., CARSON R.L. & STRINGFELLOW D.A. (2007). Noncytopathic bovine viral diarrhea virus can persist in testicular tissue after vaccination of peri-pubertal bulls but prevents subsequent infection. *Vaccine*, **25**, 867–876.

35. GROOMS D.L., BROCK K.V. & WARD L.A. (1998). Detection of bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 125–129.
36. HAMEL A.L., WASYLYSHEN M.D. & NAYAR G.P.S. (1995). Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 287–291.
37. HAMERS C., DI VALENTIN E., LECOMTE C., LAMBOT M., JORIS E., GENICOT B. & PASTORET P.-P. (2002). Virus neutralising antibodies against 22 bovine viral diarrhoea virus isolates in vaccinated calves. *Vet. J.*, **163**, 61–67.
38. HARASAWA R. (1995). Adventitious pestivirus RNA in live virus vaccines against bovine and swine diseases. *Vaccine*, **13**, 100–103.
39. HOUE H., BAKER J.C., MAES R.K., RUEGG P.L. & LLOYD J.W. (1995). Application of antibody titers against bovine viral diarrhea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**, 327–332.
40. HOWARD C.J., CLARKE M.C. & BROWNLIE J. (1985). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle sera. *Vet. Microbiol.*, **10**, 359–369.
41. HOWARD C.J., CLARKE M.C. & BROWNLIE J. (1989). Protection against respiratory infection with bovine virus diarrhoea virus by passively acquired antibody. *Vet. Microbiol.*, **19**, 195–203.
42. HOWARD C.J., CLARKE M.C., SOPP P. & BROWNLIE J. (1994). Systemic vaccination with inactivated bovine virus diarrhoea virus protects against respiratory challenge. *Vet. Microbiol.*, **42**, 171–179.
43. KATZ J.B. & HANSON S.K. (1987). Competitive and blocking enzyme-linked immunoassay for detection of fetal bovine serum antibodies to bovine viral diarrhea virus. *J. Virol. Methods*, **15**, 167–175.
44. KIM S.G. & DUBOVI E.J. (2003). A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. *Biologicals*, **31**, 103–106.
45. KIRKLAND P.D., MACKINTOSH S.G. & MOYLE A. (1994). The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet. Rec.*, **135**, 527–529.
46. LETELLIER C. & KERKHOFS P. (2003). Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus. *J. Virol. Methods*, **114**, 21–27.
47. LINDBERG A., GROENENDAAL H., ALENIUS S. & EMANUELSON U. (2001). Validation of a test for dams carrying foetuses persistently infected with bovine viral diarrhoea virus based on determination of antibody levels in late pregnancy. *Prev. Vet. Med.*, **51**, 199–214.
48. LINDBERG A., ORTMAN K. & ALENIUS S. (2000). Seroconversion to bovine viral diarrhea virus (BVDV) in dairy heifers after embryo transfer. 14th International Congress on Animal Reproduction Stockholm, Sweden, Volume I, p. 250.
49. LINDBERG A.L.E. & ALENIUS S. (1999). Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet. Microbiol.*, **64**, 197–222.
50. LOEHR B.I., FREY H.R., MOENNIG V. & GREISER WILKE I. (1998). Experimental induction of mucosal disease: consequences of superinfection of persistently infected cattle with different strains of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Arch. Virol.*, **143**, 667–679.
51. LUDEMANN L.R. & KATZ J.B. (1994). Enzyme-linked immunosorbent assay assessment of bovine viral diarrhea virus antigen in inactivated vaccines using polyclonal or monoclonal antibodies. *Biologicals*, **22**, 21–27.
52. MAKOSCHEY B., JANSSEN M.G.J., VRIJENHOEK M.P., KORSTEN J.H.M. & VANDER MAREL P. (2001). An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2. *Vaccine* **19**, 3261–3268.

53. MCGOLDRICK A., BENSAUDE E., IBATA G., SHARP G. & PATON D. J. (1999). Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestivirus RNA with fluorescent probes. *J. Virol. Methods*, **79**, 85–95.
54. MEYLING A. (1984). Detection of BVD virus in viraemic cattle by an indirect immunoperoxidase technique. In: Recent Advances in Virus Diagnosis (CEC Seminar), McNulty M.S. & McFerran J.B., eds. Martinus Nijhoff, Belfast, UK, 37–46.
55. MOENNIG V. & LIESS B. (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North. Am.*, **11**, 477–487.
56. MOENNIG V., HOUE H. & LINDBERG A. (2005). BVD control in Europe: current status and perspectives. *Anim. Health Res. Rev.*, **6**, 63–74.
57. NEATON H.J. (1986). Which BVD vaccine should I use? *Vet. Med.*, **81**, 876–881.
58. NISKANEN R. (1993). Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet. Rec.*, **133**, 341–344.
59. NISKANEN R., ALENIOUS S., BELAK K., BAULE C., BELAK S., VOGES H. & GUSTAFSSON H. (2002). Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine virus diarrhoea virus infection localized in the testes. *Reprod. Domest. Anim.*, **37**, 171–175.
60. OBRITZHAUSER W., OBRITZHAUSER G., DEUTZ A., KOFER J., MOSTL K. & SCHEIBNER H. (2002). Influence of cows persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) on BVD bulk milk diagnosis. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, **89**, 254–259.
61. PARK B.K. & BOLIN S.R. (1987). Molecular changes of bovine viral diarrhoea virus polypeptides treated with binary ethylenimine, beta-propiolactone and formalin. *Res. Rep. Rural Dev. Admin. (L&V) Korea*, **29**, 99–103.
62. PATON D.J., GOODEY R., BROCKMAN S. & WOOD L. (1989). Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. *Vet. Rec.*, **124**, 63–64.
63. PATON D.J., IBATA G., EDWARDS S. & WENSVOORT G. (1991). An ELISA detecting antibody to conserved Pestivirus epitopes. *J. Virol. Methods*, **31**, 315–324.
64. PATON D.J., SANDS J.J., LOWINGS J.P., SMITH J.E., IBATA G., EDWARDS S. (1995). A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing. *Vet. Res.*, **26**, 92–109.
65. PELLERIN C., VANDENHURK J., LECOMTE J. & TIJSSEN P. (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, **203**, 260–268.
66. RADWAN G.S., BROCK K.V., HOGAN J.S. & SMITH K.L. (1995). Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.*, **44**, 77–91.
67. REVELL S.G., CHASEY D., DREW T.W. & EDWARDS S. (1988). Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, **123**, 122–125.
68. RIDPATH J.F., BOLIN S.R. & DUBOVI E.J. (1994). Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, **205**, 66–74.
69. RUTH G.R. (1987). Bovine viral diarrhoea: a difficult infection to diagnose. *Vet. Med.*, **81**, 870–874.
70. TRAUTWEIN G., HEWICKER M., LIESS B., ORBAN S. & GRUNERT E. (1986). Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. III. Occurrence of central nervous system malformations in calves born from vaccinated cows. *J. Vet. Med.*, **B33**, 260–268.
71. TSUBOI T. & IMADA T. (1998). Detection of BVDV in bovine embryos derived from persistently infected heifers by PCR. *Vet. Rec.*, **142**, 114–115.

72. VANDERHEIJDEN N., DEMOERLOOZE L., VANDENBERGH D., CHAPPUIS G., RENARD A. & LECOMTE C. (1993). Expression of the bovine viral diarrhoea virus osloss-p80 protein: its use as ELISA antigen for cattle serum antibody detection. *J. Gen. Virol.*, **74**, 1427–1431.
73. VANROOSE G., NAUWYNCK H., VAN SOOM A., VANOPDENBOSCH E. & DE KRUIF A. (1998). Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in zona-free and zona-intact *in vitro*-produced bovine embryos and the effect on embryo quality. *Biol. Reprod.*, **58**, 857–866.
74. VILCEK S., PATON D.J., DURKOVIC B., STROJNY L., IBATA G., MOUSSA A., LOITSCH A., ROSSMANITH W., VEGA S., SCICLUNA M.T. & PALFI V. (2001). Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.*, **146**, 99–115.
75. VOGES H., HORNER G.W., ROWE S. & WELLENBERG G.J. (1998). Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viremic bull. *Vet. Microbiol.*, **61**, 165–175.
76. WALZ P.H., BELL T.G., GROOMS D.L., KAISER L., MAES R.K. & BAKER J.C. (2001). Platelet aggregation responses and virus isolation from platelets in calves experimentally infected with type 1 or type II bovine viral diarrhoea virus. *Can. J. Vet. Res.*, **65**, 241–247.
77. WILHELMSSEN C.L., BOLIN S.R., RIDPATH J.F., CHEVILLE F.N. & KLUGE J.P. (1991). Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.*, **52**, 269–275.
78. ZIMMER G., SCHOUSTRA W. & GRAAT E. A.M. (2002). Predictive values of serum and bulk milk sampling for the presence of persistently infected BVDV carriers in dairy herds. *Res. Vet. Sci.*, **72**, 75–82.

*

* *

NB: Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la diarrhée virale 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).

PÉRIPNEUMONIE CONTAGIEUSE BOVINE

RÉSUMÉ

*La péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) est une maladie des bovins due à *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (MmmSC ; SC = small colonies). Elle se manifeste par de l'anorexie, de la fièvre et des symptômes respiratoires tels que de la dyspnée, de la polypnée, de la toux et un écoulement nasal. Le diagnostic nécessite l'isolement de l'agent étiologique. La principale difficulté de contrôle et d'éradication provient de la fréquence élevée d'infections sub-cliniques ou asymptomatiques et de l'existence d'un portage chronique persistant après une phase clinique.*

Identification de l'agent pathogène : *sur l'animal vivant les prélèvements à réaliser sont des écouvillonnages nasaux, et/ou des lavages broncho-alvéolaires, ou du liquide pleural obtenu par ponction. À l'autopsie les prélèvements à réaliser sont des lésions du poumon, des nœuds lymphatiques, du liquide pleural et synovial pour les animaux avec des arthrites. L'examen direct d'exsudats ou de calques est possible mais exige une grande expérience.*

Pour cultiver l'agent pathogène, les tissus sont broyés dans un milieu avec antibiotiques et inoculés dans des milieux contenant des inhibiteurs afin de prévenir le développement des bactéries contaminantes. La culture de MmmSC nécessite plusieurs jours.

En bouillon, une croissance est décelable après 3 à 10 jours sous forme d'une turbidité homogène avec des tourbillons à l'agitation ; sur gélose, de petites colonies, 1 mm de diamètre, à l'aspect typique en « œuf sur le plat » se développent. Les caractéristiques biochimiques de MmmSC sont les suivantes : sensibilité à la digitonine, réduction des sels de tétrazolium, fermentation du glucose, absence d'hydrolyse de l'arginine, absence d'activité phosphatasique et protéolytique. Des milieux spéciaux ont été décrits pour la réalisation des ces tests. L'identification est confirmée par des tests immunologiques, tels que les tests d'inhibition de croissance et d'immunofluorescence (les deux utilisant des sérums hyperimmuns). L'amplification en chaîne par polymérase (PCR), un test rapide, spécifique, sensible et facile à mettre en œuvre, est désormais utilisée.

Épreuves sérologiques : *pour le diagnostic, le test modifié de fixation du complément de Campbell et Turner demeure l'épreuve prescrite pour les échanges internationaux. Cependant il présente des limites certaines en matière de sensibilité et de spécificité. La méthode immuno-enzymatique (ELISA) de compétition a été désignée comme épreuve prescrite pour les échanges internationaux par le Comité International de l'OIE en mai 2004. Un test d'immuno-empreinte est en cours d'évaluation, il est décrit comme hautement spécifique et sensible.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *l'utilisation de souches atténuées est désormais recommandée pour la production de vaccin : il s'agit des souches T1/44 et T1sr. Le titre minimal requis est de 10^7 mycoplasmes viables par dose de vaccin, mais un titre supérieur d'au moins 10^8 est recommandé.*

A. INTRODUCTION

La péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) est une maladie contagieuse des bovins due à *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (MmmSC ; SC = small colonies). L'existence de la PPCB est connue en Europe depuis le XVI^e siècle, mais son extension mondiale ne date que de la seconde partie du XIX^e siècle, suite à l'accroissement des échanges internationaux d'animaux vivants. La PPCB a été éliminée de nombreux pays dès le début du XX^e siècle par l'application de politiques d'abattage total. Cependant la maladie persiste dans

beaucoup de régions africaines ; en Asie, la situation est mal connue. Aucun foyer n'a été déclaré en Europe depuis 1999. Dans les conditions naturelles, *MmmSC* n'affecte que les ruminants du genre *Bos*, c.à.d. principalement, les bovins et les zébus. *MmmSC* a été isolé de buffles en Italie (*Bubalus bubalis*) (36) et chez des moutons et des chèvres en Afrique et plus récemment au Portugal et en Inde (37). Parmi les animaux sauvages un seul cas a été décrit chez le bison américain (*Bison bison*) mais aucun chez le buffle africain (*Syncerus caffer*) ou d'autres ruminants sauvages. Les animaux sauvages ne jouent pas de rôle épidémiologique dans la maladie. La PPCB se manifeste par de l'anorexie, de la fièvre et des symptômes respiratoires tels que de la dyspnée, polypnée, toux et écoulement nasal. Dans des conditions expérimentales, le taux de mortalité peut atteindre 50 % dans le cas de foyers aigus, en l'absence de traitement antibiotique. Cependant quand un foyer éclate dans une zone indemne, la mortalité s'avère élevée, mais retombe souvent à un niveau inférieur après l'apparition du foyer primaire. Les symptômes cliniques ne sont pas toujours évidents. Des formes sub-aiguës ou asymptomatiques sont fréquentes car les signes cliniques diminuent ou disparaissent avec la guérison partielle des animaux infectés. Dans ce cas leur poumons montrent des lésions encapsulées dénommées « séquestres ». Ces animaux peuvent être à l'origine de la persistance inapparente de l'infection dans un troupeau ou une région et jouent un rôle prépondérant dans l'épidémiologie de la maladie. La transmission de la maladie se fait par contact direct entre un animal infecté et un animal sensible. Il n'y a pas de preuve de transmission par des matières contaminées, car *MmmSC* ne persiste pas dans l'environnement. Dans la plupart des continents, les stratégies de contrôle sont basées sur le dépistage précoce des foyers, le contrôle des mouvements d'animaux et une politique d'abattage total. En Afrique, le contrôle de la maladie est basée sur des campagnes de vaccination utilisant des souches atténuées telle que la T1/44 ou la T1sr. Bien que l'utilisation des antibiotiques soit théoriquement interdite, ils sont largement employés sur le terrain. Les conséquences de ces traitements antibiotiques en terme d'efficacité clinique, l'émergence de souches résistantes et la persistance de porteurs chroniques n'ont pas encore été évaluées. Cependant, des travaux récents ont démontré que le traitement des bovins par des antibiotiques pouvait réduire considérablement la transmission de la maladie à des animaux sains en contact, mais que pour ce faire il convenait de traiter tous les animaux malades du troupeau (20). Le groupe « *M. mycoides* » comprend 6 espèces mycoplasmatiques ou groupes de souches, ayant pour hôtes les bovins et les caprins (11, 32, 39). Ce groupe se subdivise en deux entités, *capricolum* et *mycoides*, contenant des espèces très proches. Ces 6 mycoplasmes partagent des caractéristiques sérologiques et génétiques à l'origine de problèmes de taxonomie et de diagnostic (11) avec les méthodes classiques. Une identification spécifique de *MmmSC* peut être désormais réalisée par une amplification en chaîne par polymérase (PCR) ou avec des anticorps monoclonaux spécifiques (AcM). Bien que *MmmSC* soit considéré comme un biotype très homogène, de récentes techniques moléculaires, telles que la digestion enzymatique de l'ADN génomique ou le transfert d'ADN sur support solide (*Southern blotting*) en utilisant comme sonde une séquence d'insertion, permettent de caractériser des différences entre les souches. L'analyse par séquençage de plusieurs loci (ou « *typing* »), une technique récemment décrite, permet de réaliser de manière simple de l'épidémiologie moléculaire de la PPCB. Cette technique permet de séparer 3 principaux sous-groupes qui correspondent aux grandes origines géographiques (Europe, Afrique du Sud, reste de l'Afrique) (24). Il est tout à fait intéressant de noter que les souches isolées en Europe peuvent être nettement différenciées des souches d'origine africaine (10, 16, 42). Les souches européennes récentes constituent un sous-groupe particulier et se différencient de toutes les autres souches par l'absence de duplication d'un fragment d'ADN de 17 kb (15) et par la délétion d'un fragment de 8,4 kb. Elles ne sont pas capables d'oxyder le glycérol, ce qui pourrait expliquer leur pouvoir pathogène apparemment plus faible (19, 43). Cependant les souches européennes les plus anciennes (1967) conservées dans des collections apparaissent comme une souche unique sans duplication ni délétion. Les souches africaines semblent être plus diversifiées. La séquence complète du génome de la souche de référence PG1 a été récemment publiée (45). Il est certain que des développements techniques futurs permettront une caractérisation plus fine des souches.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

L'organisme responsable peut être isolé de prélèvements réalisés soit sur l'animal vivant soit sur cadavre. Les prélèvements sur animal vivant consistent en des écouillons nasaux, du jetage, des lavages broncho-alvéolaires ou des lavages trachéo-bronchiques, et du liquide pleural prélevé stérilement au niveau de la partie inférieure de la cavité thoracique entre la septième et la huitième côte. Le sang peut aussi être mis en culture (21). Les échantillons prélevés à l'autopsie sont fragments de poumon avec lésions, du liquide pleural (« lymphes »), des nœuds lymphatiques du tractus broncho-pulmonaire, et du liquide synovial chez les animaux avec des arthrites. Les échantillons devront être prélevés à partir des lésions dans l'interface tissu affecté et tissu sain.

L'agent peut être détecté par culture, par des méthodes génétiques et des tests immunologiques décrits ci-dessous. L'identification bactériologique de l'agent est plus complexe et peut être réalisée par des tests biochimiques, des méthodes d'identification génétiques et immunologiques. Ces méthodes sont ici décrites de façon générale ; il est recommandé que l'identification définitive soit réalisée par un Laboratoire de référence de l'OIE.

La quantité d'organismes pathogènes varie beaucoup selon le stade de développement des lésions, un résultat négatif ne permet pas de conclure, notamment après un traitement antibiotique.

Pour l'acheminement des prélèvements vers le laboratoire, il est recommandé d'utiliser un milieu de transport qui protégera les mycoplasmes et préviendra la prolifération d'autres bactéries (bouillon d'infusion de cœur sans peptone et glucose, 10 % d'extrait de levure ; 20 % de sérum, 0,3 % d'agar, 500 unités internationales [UI]/ml de pénicilline, acétate de thallium 0,2 g/litre).

Les échantillons doivent être conservés, pour quelques jours au froid à 4 °C ou pour une période plus longue congelés à -20 °C ou moins. Pour un transfert de laboratoire à laboratoire les fragments de poumons et le liquide pleural peuvent être lyophilisés.

a) Culture

MmmSC exige des milieux appropriés pour être cultivé (35). Lors de tentatives d'isolement, 2 à 3 passages en aveugle peuvent être nécessaires. Beaucoup d'essais d'isolement échouent car cet organisme est labile, souvent présent en faibles quantités et exigeant quant à ces besoins de croissance. Les milieux doivent être au minimum composés d'une base (telle qu'une infusion de cœur ou peptone), d'un extrait de levure (de préférence frais) et de sérum de cheval (10 %). Plusieurs autres composants peuvent être incorporés tels que du glucose, du glycérol, de l'ADN et des acides gras, mais leur utilité varie selon les souches. Afin d'éviter le développement d'autres bactéries, des inhibiteurs tels que la pénicilline, la colistine ou l'acétate de thallium sont nécessaires. Ces milieux peuvent être utilisés sous forme de bouillon ou à l'état solide avec 1,0 à 1,2 % d'agar. Tous milieux préparés doivent faire l'objet d'un témoin de qualité et doivent assurer la croissance de faibles inoculums de *Mycoplasma* spp. La souche de référence doit être cultivée parallèlement aux échantillons suspects pour s'assurer que la procédure est correctement réalisée.

Après broyage dans un bouillon contenant des antibiotiques, les échantillons de poumons sont dilués de 10 en 10 pour minimiser la contamination bactérienne et sont inoculés dans 5 tubes de bouillon et sur milieu solide. Le liquide pleural peut être inoculé directement sans dilution préalable. L'utilisation de sacs scellés pour les boîtes de Petri ou d'incubateur à hygrométrie contrôlée est recommandée pour éviter une dessiccation. Pour s'assurer les meilleures conditions de croissance, l'incubation devrait être réalisée en présence de CO₂, dans un incubateur à CO₂ ou une jarre avec une bougie. Les boîtes de Petri et les tubes sont examinés au 5^e et au 10^e jours. En milieu liquide, une turbidité homogène apparaît dans les 2 à 4 jours, avec fréquemment des filaments soyeux et fragiles dénommés « comètes » qui sont caractéristiques de *MmmSC* (ou de *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, l'agent responsable de la pleuropneumonie contagieuse caprine). Au cours des jours suivants une opacité uniforme se développe avec la formation de tourbillons lors de l'agitation. Sur milieu gélosé, les colonies sont petites (1 mm de diamètre) et ont l'aspect classique d'« œuf sur le plat » avec un centre dense. À ce stade, l'épreuve indirecte des anticorps fluorescents ou une épreuve de PCR peuvent être mises en œuvre.

b) Tests biochimiques

Pour une utilisation en routine sur le terrain, les tests immunologiques et la PCR sont suffisants, mais quand ils donnent des résultats ambigus, les tests biochimiques peuvent être utilisés. Ces tests doivent être réalisés par un laboratoire de référence. Pour cela, après 2 ou 3 sub-cultures, les antibiotiques ne sont plus inclus dans le milieu afin de vérifier si l'isolat est un mycoplasme ou une bactérie sous forme L qui reprendra son aspect classique dans un milieu sans inhibiteur. Un fois ce test réalisé et après clonage (au moins 3 colonies devraient être sélectionnées), l'organisme peut être identifié à l'aide des tests biochimiques (2, 14).

MmmSC est sensible à la digitonine (comme tous les membres de l'ordre des Mycoplasmatales), ne produit pas de « film et spots », fermente le glucose, réduit les sels de tétrazolum (en aérobose ou en anaérobose), n'hydrolyse pas l'arginine, n'a pas d'activité phosphatase et n'a pas (ou très faiblement) d'activité protéolytique.

Pour ces tests, des milieux spécifiques ont été développés. Ils sont composés des mêmes ingrédients de base (bouillon d'infusion de cœur ou de Bacto PPLO [*pleuropneumonia-like organisms*], sérum de cheval, 25 % de solution d'extrait de levure, 0,2 % de solution d'ADN) auxquels sont rajoutés 1 % d'une solution de glucose à 50 % pour l'hydrolyse du glucose, 4 % d'une solution tamponnée (HCl) à 38 % d'arginine pour l'hydrolyse de l'arginine et 1 % d'une solution à 2 % de chlorure de triphényl tétrazolum pour la réduction du tétrazolum, plus un indicateur de pH (rouge de phénol). (Note : un indicateur de pH ne doit pas être ajouté à un milieu contenant du chlorure de triphényl tétrazolum). Pour caractériser l'activité protéolytique, une culture est réalisée sur de la gélose à la caséine et/ou sur de la gélose au sérum coagulé.

Une fois que les caractéristiques biochimiques ont été testées, un des tests immunologiques suivants peut être réalisé pour confirmer l'identification : le test d'inhibition de croissance autour de disques (EICD), l'épreuve d'immunofluorescence (IF) et le test d'immuno-dépôt sur membrane de filtration (MF-dot).

L'isolement et l'identification de l'agent de la PPCB peuvent s'avérer difficiles, fastidieux et dépendent du respect scrupuleux des procédures et des milieux appropriés. Quand cela est possible, les laboratoires de bactériologie classique devraient mettre en place une section particulière traitant uniquement des mycoplasmes.

c) Méthodes d'identification des acides nucléiques

Des sondes marquées par des enzymes ou par des éléments radioactifs ont été développées, mais elles ont été dépassées par la technologie PCR, plus facile à réaliser et plus sûre.

La PCR est sensible, hautement spécifique, rapide et relativement facile à réaliser. Des amorces spécifiques vis-à-vis du groupe « *M. mycoides* » (38) et de *MmmSC* (12, 29, 31) ont été décrites et des tests PCR ont été développés (5, 12, 29), dont une nouvelle technique assurant spécifiquement l'identification des souches vaccinales T1 (25). Sur des prélèvements tels que des exsudats de poumon, la PCR peut être réalisée directement après des centrifugations différentielles pour éliminer les cellules inflammatoires et sédimenter les mycoplasmes. Lorsque les prélèvements sont des morceaux de poumon, la PCR est réalisée après extraction de l'ADN. La PCR peut être aussi réalisée sur l'urine ou le sang. L'avantage principal de la technique PCR est qu'elle est réalisable sur des prélèvements mal conservés (contaminés ou sans mycoplasmes viables comme cela peut arriver après un traitement antibiotique). Si la détection directe de l'ADN issue d'un organe à tester échoue, les prélèvements doivent être enrichis par culture en milieu approprié pendant 24 à 48 h puis l'essai de détection d'ADN est fait sur cette culture. La PCR est devenue l'outil principal pour l'identification de *MmmSC*. Si un échantillon en provenance d'une région indemne de PPCB est positif en PCR, le test doit être confirmé par une seconde épreuve de PCR différente ; l'infection peut être confirmée par l'utilisation d'un seul test immunologique.

L'un des inconvénients de la PCR est la possibilité de contaminations si les précautions indispensables et le système de gestion de la qualité ne sont pas mis en œuvre correctement dans la laboratoire de diagnostic. Il convient de prendre le plus grand soin afin de respecter la séparation entre les sections du laboratoire qui pourraient être contaminées par des produits de PCR (comme par exemple la salle d'électrophorèse) et les sections dédiées à la préparation des réactifs pour la PCR.

L'arrivée de la PCR en temps réel devrait résoudre ces problèmes puisque la fluorescence qui résulte de l'amplification du génome est mesurée directement sans ouverture des tubes. Cette technique a déjà été appliquée à la détection de *MmmSC* (17) et des améliorations ultérieures sont attendues dans un proche avenir.

d) Épreuves immunologiques

L'agent étiologique ou ses antigènes peuvent être mis en évidence par des épreuves immunologiques sur des tissus infectés, des extraits de tissus et/ou des cultures de l'organisme. Cependant comme certains de ces épreuves dépendent qu'un minimum d'organismes soit présent dans l'échantillon, seuls les résultats positifs doivent être pris en compte.

i) Épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI)

L'IFI peut être réalisée sur des frottis de matériel clinique en utilisant un sérum hyperimmun de lapin anti-*MmmSC* et des IgG anti-bovin marquées. Des sérums hyperimmuns de bovin ont été utilisés, mais ils peuvent renfermer des anticorps induisant des réactions croisées. Le test est satisfaisant quand il est appliqué à des frottis de liquide pleural, mais moins avec des frottis de poumons en raison d'une importante fluorescence aspécifique. Cependant de bons résultats peuvent être obtenus sur des frottis de poumons contremarqués avec du noir d'Erichrome.

ii) Épreuve d'immunofluorescence (IF)

L'IF est habituellement réalisée sur des cultures en bouillon ou sur gélose. Elle est moins spécifique que l'IFI.

Culture en bouillon : mettre 2 gouttes sur une lamelle de microscope. Fixer pendant 15 min avec de l'alcool méthylique, et laisser en contact avec le sérum hyperimmun marqué pendant 30 min à 37 °C en atmosphère humide. Rincer 3 fois avec un tampon phosphate (PBS, pH 7,2) et examiner sous un microscope à épifluorescence (×80).

Colonies sur milieu solide : couper un bloc de gélose portant à sa surface de nombreuses colonies jeunes et placer sur une lame, la face avec les colonies au dessus. Mettre 1 ou 2 gouttes de sérum hyperimmun marqué sur le bloc et laisser en atmosphère humide pendant 30 min. Placer le bloc dans un tube et laver 2 fois 10 min avec du PBS. Remplacer le bloc sur une lame avec les colonies au dessus et examiner comme ci-dessus.

Culture en boîte de Petri : la gélose ne doit pas être trop épaisse (pas plus de 3 mm) et doit contenir le moins possible de sérum de cheval. Rincer le gel 3 fois avec du PBS, inonder la surface avec 1 ml de sérum marqué et incuber pendant 30 min en chambre humide. Rincer 4 fois avec du PBS et examiner directement sous le microscope. L'IF en boîte de Petri est principalement utilisée juste après isolement et avant clonage car elle est très utile dans le cas d'infection mixte avec plusieurs espèces de mycoplasmes.

Interprétation de l'IF : avec le bouillon de culture, les mycoplasmes apparaissent vert intense sur un fond sombre. Cependant une certaine expérience est utile pour l'IF réalisée sur colonies sur gélose, car l'arrière fond apparaît vert sombre.

iii) *Épreuve d'inhibition de croissance autour de disques*

L'EICD est basée sur l'inhibition directe de la croissance de l'agent en milieu solide à l'aide d'un sérum hyperimmun spécifique (14). Cependant des réactions croisées au sein du groupe « *M. mycoides* » sont fréquentes et la distinction entre *MmmSC* (biotype bovin) et *MmmLC* (biotype caprin ; LC : *large colonies*) nécessite une grande prudence. C'est un test simple à réaliser mais certains résultats demandent de l'expérience lors de l'interprétation : petites zones d'inhibition (moins de 2 mm), inhibition partielle avec des colonies résistantes, réactions faussement positives et faussement négatives (très rares). La qualité du sérum hyperimmun retenu est cruciale pour de bons résultats.

iv) *Épreuve d'immunodiffusion en gélose*

L'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) permet de détecter l'antigène spécifique présent à la surface de *MmmSC* et le galactane circulant qui envahit le système hémolymphatique des animaux malades (18). Le liquide pleural, des fragments broyés de poumons ou même des séquestres peuvent être testés contre un sérum hyperimmun par dépôt dans 2 puits découpés dans le gel et distants de 5 mm. Le gel est composé d'agar Noble (12 g) et d'acétate de thallium (0,2 g/litre) en PBS, pH 7,2 (1 000 ml). Ce test est considéré comme peu sensible et sa spécificité reste mal connue, mais il a servi comme test de dépistage et seules des réactions positives peuvent être prises en compte. Les résultats sont améliorés en incubant la boîte à 37 °C et peuvent être lus dans les 24 h. Un test de terrain plus simple a été développé, il utilise des disques de papier imprégnés au lieu des puits (34).

v) *Immuno-dépôt sur membrane de filtration (dot-MF)*

Le test dot-MF peut être utilisé en routine pour l'identification au laboratoire (33). Des AcMs spécifiques du biotype SC ont été développés et permettent de résoudre le problème des réactions croisées avec le groupe « *mycoides* » (8).

vi) *Immunohistochimie*

Des sites antigéniques de *MmmSC* peuvent être mis en évidence dans les lésions pulmonaires en utilisant la méthode peroxydase-antiperoxydase sur des sections de matériel inclus en paraffine (13). Puisque l'isolement de l'agent n'est pas toujours réalisable dans les cas chroniques et après un traitement antibiotique, ce test est un test complémentaire pour le diagnostic de la PPCB (6) ; un résultat négatif n'a pas de valeur diagnostique.

2. Épreuves sérologiques

Les épreuves sérologiques pour la PPCB n'ont de signification qu'au niveau du troupeau. Des épreuves réalisées sur des animaux isolés peuvent être inexacts, soit parce que l'animal est en stade précoce de la maladie avant que des anticorps spécifiques n'apparaissent, ou, soit parce qu'il peut être en phase chronique durant laquelle très peu d'animaux sont séropositifs.

a) **Fixation du complément (épreuve adaptée pour établir le statut « indemne de maladie » et épreuve prescrite pour les échanges internationaux)**

Le test de fixation du complément de Campbell et Turner (FC) reste la procédure recommandée (bien que la méthode actuelle soit légèrement différente de l'originale), il est largement utilisé dans tous les pays dans lesquels l'infection existe (35). Le test de FC, en micro-méthode a fait l'objet d'une harmonisation au niveau de l'Union Européenne (27). Pour le titrage de l'antigène et pour des raisons d'harmonisation, un sérum de référence international de bovin positif est disponible au Laboratoire de Référence de l'OIE à Teramo, Italie. Cependant le test de FC est toujours difficile à réaliser, nécessitant un bon entraînement et du personnel expérimenté.

- **Réactifs**

- Tampon véronal (TV), pH 7,3. Une solution mère concentrée est utilisée diluée au 1/5 en eau doublement distillée et stérile ;
- Les échantillons de sérum, débarrassés d'hématies, doivent être impérativement inactivés à 56 °C pendant 30 min et dilués au 1/10 en TV ;
- L'antigène est une suspension de *MmmSC*, préalablement titré en échiquier et utilisé à la dose de 2 unités fixant le complément (unités FC). Il doit impérativement être conservé à 4 °C et ne pas être congelé. Il est produit, testé et fourni par des laboratoires reconnus au niveau international ;
- Le complément (C') provient de sérum de cobaye. Il est lyophilisé et reconstitué avec de l'eau doublement distillée. Il doit impérativement être conservé à –20 °C après reconstitution. Il est titré en faisant des séries de dilutions proches en TV contenant une quantité appropriée d'antigène utilisé pour le test. Après incubation à 37 °C pendant 2 h, une quantité adéquate d'hématies sensibilisées de mouton (HSM) est ajoutée à chacune des dilutions. Le titre est lu après une incubation supplémentaire de 1 h. La dilution la plus forte donnant une hémolyse complète des HSM équivaut à une unité complément (C'), la dilution nécessaire pour 2,5 unités dans 25 µl peut être ainsi calculée ;
- L'hémolysine est un sérum hyperimmun de lapin anti-HSM. La quantité utilisée est 6 unités hémolytiques lues à 50 % final (UH₅₀ [50 % unité d'hémolyse]) ;
- Les HSM sont obtenues par ponction aseptique de la veine jugulaire. Elles peuvent être conservées dans une solution de Alsever ou dans du citrate de sodium. Elles sont utilisées en suspension à 6 % ;
- Le couple hémolytique (CH) est préparé en diluant l'hémolysine en TV pour obtenir un titre de 12 UH₅₀. Un volume égal de la suspension à 6 % de HSM est additionné, et le système est sensibilisé au bain marie à 37 °C pendant 30 min avec agitation régulière ;
- Les sérums de références de bovins positifs (SP) proviennent d'animaux naturellement infectés, mais sans anticorps vis-à-vis de *Brucella*, du virus de la diarrhée virale bovine, du virus respiratoire syncytial, du virus de la rhinotrachéite bovine, des adénovirus, de l'herpèsvirus bovin type 4, des virus de la fièvre aphteuse, du virus de la leucose bovine et du virus parainfluenza 3. Les animaux infectés sont aussi dépourvus d'anticorps dirigés contre les virus contaminants ;
- Le sérum témoin négatif (SN) est un sérum de bovin sain, négatif vis-à-vis des microorganismes cités ci-dessus.

- **Protocole (en microplaques)**

- Répartir 25 µl des échantillons de sérum à tester (préalablement dilué au 1/10). Additionner 25 µl d'antigène à une concentration de 2 unités FC.
- Ajouter 25 µl de C' à la concentration de 2,5 unités. Agiter fortement et incubé à 37 °C pendant 30 min en agitant régulièrement.
- Additionner 25 µl de CH. Agiter fortement et incubé à 37 °C pendant 30 min en agitant régulièrement.

Il est nécessaire de procéder aux témoins suivants :

Complément : 0,5 unités, 1 unité et 2,5 unités.

Couple hémolytique : 75 µl de TV + 25 µl de couple hémolytique.

Antigène : 25 µl de 2 unités FC d'antigène + 25 µl de C' à 2,5 unités + 25 µl de CH = 25 µl de tampon véronal.

Note : les microplaques doivent impérativement être agitées vigoureusement 2 fois au cours de la période d'incubation. Les témoins mentionnés plus haut, le SP et le SN sont systématiquement introduits dans chaque microplaque ou dans une série de microplaques quand les mêmes lots de réactifs sont utilisés.

- Lecture et interprétation des résultats* : après centrifugation des microplaques à 125 g pendant 2 min, la lecture est réalisée sur la base du pourcentage de fixation du complément observé.

Résultat positif : 100 % d'inhibition de l'hémolyse au 1/10 ;

Résultat douteux : 25, 50 ou 75 % inhibition de l'hémolyse au 1/10.

Il est recommandé que pour toute fixation du complément, même partielle (25, 50 ou 75 %), à une dilution au 1/10, des investigations complémentaires soient réalisées.

Les limites du test de FC sont bien connues. Avec une sensibilité de 70 % et une spécificité de 98 % (7), le test de FC peut détecter presque tous les animaux malades avec des lésions aiguës, mais une assez faible proportion des animaux aux stades précoces de la maladie ou avec des lésions chroniques. De plus, des interventions thérapeutiques et des opérations de prophylaxie mal conduites (abattage partiel du troupeau) peuvent augmenter le nombre de réactions faussement négatives. Cependant, pour des groupes d'animaux (troupeaux ou unité épidémiologique) le test de FC permet de détecter pratiquement 100 % des groupes infectés.

La nature du processus pathogène de la maladie est telle que la période d'incubation durant laquelle les anticorps ne sont pas détectables par le test de FC, peut se prolonger plusieurs mois.

Malgré la haute spécificité du test de FC, des résultats faussement positifs peuvent apparaître, la raison principale étant des réactions croisées avec d'autres mycoplasmes, en particulier les autres membres du groupe *M. mycoides*. La pertinence des résultats doit être confirmée par l'examen *post mortem* et bactériologique, et par des épreuves sérologiques sur du sang pris au moment de l'abattage.

b) Méthode immuno-enzymatique de compétition (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Une méthode immuno-enzymatique (ELISA) de compétition (c-ELISA) développé par le Centre collaborateur de l'OIE pour le diagnostic et le contrôle des maladies animales en pays tropicaux (voir le tableau donné en partie 3 de ce *Manuel terrestre*) (23), a été évaluée (3). Un test ELISA indirect utilisant un antigène lipoprotéique est actuellement en cours de validation par l'AIEA (1, 9). En mai 2004, le c-ELISA a été désigné comme épreuve prescrite pour les échanges internationaux par le Comité international de l'OIE. Comparé au test de FC, le c-ELISA présente une sensibilité équivalente et une plus grande spécificité. Le suivi par un système de gestion de la qualité est plus facile à assurer pour les résultats des techniques ELISA. Des informations sur la disponibilité de réactifs peuvent être obtenues auprès du Laboratoire de référence OIE pour la PPCB ou du Centre collaborateur pour le diagnostic des maladies animales par l'ELISA et les techniques moléculaires (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel Terrestre*).

Des tests de validation (3, 23) qui ont été réalisés dans plusieurs pays africains et européens indiqueraient i) que la spécificité réelle de ce c-ELISA serait de 99,9 % au moins ; ii) que la sensibilité de ce c-ELISA est comparable à celle du test de FC et iii) que des anticorps sont détectés par le c-ELISA dans les troupeaux infectés bien avant d'être caractérisés par le test de FC. En outre, les anticorps du C-ELISA persistent plus longtemps (30).

Ce c-ELISA est maintenant produit en kit de diagnostic prêt à l'emploi qui contient tous les réactifs nécessaires incluant les plaques pré-sensibilisées, conservées dans des enveloppes scellées en papier d'aluminium. Le kit de diagnostic a été spécialement conçu pour être robuste et démontre une bonne reproductibilité. De ce fait, les sérums sont analysés en cupule unique. Le substrat a été modifié et est maintenant du TMB (tétraméthyl benzidine) en tampon liquide et la lecture se fait à 450nm. La couleur du substrat change du vert pâle au bleu au début et devient jaune une fois la solution d'arrêt ajoutée. Les puits témoins avec les anticorps monoclonaux affichent une couleur plus sombre tandis que les sérums témoins fortement positifs sont très pâles. Le seuil a été placé à 50 % et devrait être validé pour chaque pays.

• Réactifs

- i) L'antigène de base est préparé par lavage d'une suspension concentrée de mycoplasmes (2 mg/ml) et lysés avec du sulfate dodécyl de sodium à 1 %. Cet antigène de base est conservé à -20 °C jusqu'à utilisation ;
- ii) Les anticorps monoclonaux sont disponibles au Centre collaborateur de l'OIE pour le Diagnostic et le Contrôle des Maladies Animales en Régions Tropicales (voir le Tableau présenté en Partie 3 de ce *Manuel terrestre*) ;
- iii) Le conjugué DAKO P260 est utilisé, dilué dans du PBS selon les indications du fournisseur, auquel on ajoute 0,5 % de sérum de cheval et 0,05 % de Tween 20 ;
- iv) Le substrat est fait de 1mM ABTS (2,2'-azino-bis-[acide 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonique]) et H₂O₂ en tampon citrate.

• Protocole

- i) Les plaques ELISA sont sensibilisées avec une solution en PBS d'antigène lysé, pH 7,4 (100 µl/cupule), et incubées une nuit à 4 °C ;
- ii) Les plaques sont lavées une fois en PBS dilué au 1/5 avec 0,05 % de Tween 20 ;

- iii) Les sérums qui n'auront pas été inactivés par la chaleur (dilués au 1/10) et l'anticorps monoclonal dilué en PBS avec 0,5 % de sérum de cheval et 0,05 % de Tween 20 sont laissés en contact avec l'antigène pendant 1 h à 37 °C sous agitation modérée en chambre humide. Les sérums inactivés par la chaleur ne donneront pas de résultat satisfaisants ;
- iv) Les plaques sont lavées 2 fois et le conjugué est ajouté dans toutes les cupules (100 µl) ; les cupules sont ensuite incubées pour 1 h à 37 °C ;
- v) Les plaques sont lavées 3 fois et le substrat est ajouté dans toutes les cupules (100 µl) ;
- vi) La lecture se fait à 405 nm quand la densité optique dans le puits témoin avec les anticorps monoclonaux a atteint 0,8 à 1,6.

c) Épreuve d'immuno-empreinte (Immunoblotting test)

Un test d'immuno-empreinte intéressant pour le diagnostic a été développé. Une évaluation sur le terrain indique une sensibilité et une spécificité plus élevées que le test de FC. Un profil type existe composé de différentes bandes antigéniques immuno-dominantes, qui est retrouvé aussi bien sur les bovins expérimentalement que naturellement infectés. La séparation par électrophorèse des différents antigènes de *MmmSC* par cette technique permet d'obtenir une image plus détaillée de la réponse immunitaire des animaux, ainsi ce test résout-il les problèmes liés aux réactions aspécifiques. Il devrait être principalement utilisé comme test de confirmation, après d'autres tests et devrait être utilisé chaque fois que l'on suspecte une fausse réaction par le test de FC.

• **Préparation des bandelettes d'antigènes**

- i) L'antigène est préparé par centrifugation et lavage d'une suspension de cellules mycoplasmiques provenant d'une culture de 48 h ;
- ii) Un gel en gradient de polyacrylamide de dodécyl sulphate de sodium (SDS-PAGE, zone de concentration à 4 % et zone de résolution en gradient de 5 à 15 %), est préparé et utilisé pour faire l'électrophorèse de l'échantillon avec les masses moléculaires appropriées ;
- iii) Les protéines séparées sont transférées sur une membrane de nitrocellulose aux pores de 0,45 µm de 14 × 14 cm selon un voltage constant de 70 V dans du tampon de transfert (20 % de méthanol dans 193 mM glycine, 25 mM de Tris/HCl, pH 8,3) ;
- iv) La membrane est séchée et marquée pour indiquer la face sur laquelle les protéines ont été transférées. La membrane de nitrocellulose est incubée en tampon de blocage (PBS avec 5 % de lait écrémé, glycine 1 M et 1 % d'albumine d'œuf) pendant 2 h à température ambiante. Après 3 lavages de 15 min en PBS avec 0,1 % (v/v) Tween 20 à température ambiante, la membrane de nitrocellulose est relavée en PBS uniquement. La feuille est ensuite séchée et une bandelette est coupée puis testée. Les bandes spécifiques sont à 110, 98, 95, 62/60 et 48 kDa ;
- v) La feuille de nitrocellulose est coupée en bandelettes de 0,4 cm de large et chacune est marquée. Ces bandelettes constituent l'antigène utilisé pour l'épreuve d'immuno-empreinte.

• **Protocole**

NB : Durant l'essai, l'antigène doit toujours être placé sur la face supérieure des bandelettes.

- i) Les échantillons à tester sont dilués au 1/3 et les sérums témoins positif et négatif sont préparés en utilisant un tampon de dilution (PBS contenant 0,1 % de lait écrémé et 0,1 % d'albumine d'œuf) ;
- ii) Une bandelette antigène est immergée dans chaque échantillon à tester (et les témoins) et incubée à 37 °C pendant 2 h en agitation continue. Les bandelettes sont ensuite lavées comme au-dessus ;
- iii) Les bandelettes sont incubées dans une dilution appropriée d'un conjugué à la peroxydase anti-IgG bovine (chaînes H + L) dilué en tampon pendant 1 h en agitation et à température ambiante. Laver comme précédemment ;
- iv) La solution révélatrice est réalisée en additionnant : 30 mg de 4-chloro-1-naphthol pré-dissous dans 10 ml de méthanol à 50 ml de PBS et 30 µl de H₂O₂. Les bandelettes sont immergées dans ce révélateur, laissées ensuite dans le noir en agitation continue et examinées périodiquement jusqu'à ce que les bandes soient suffisamment sombres. La réaction est arrêtée avec de l'eau distillée ;
- v) *Lecture des résultats* : Les bandelettes sont séchées et examinées en recherchant le profil d'immuno-empreinte des IgG spécifiques caractérisé par la présence simultanée de 5 bandes antigéniques spécifiques de 110, 98, 95, 62/60 et 48 kDa. Les sérums donnant un profil immunologique présentant simultanément ces 5 bandes sont considérés comme positifs.

d) Autres épreuves

Un test de terrain d'agglutination rapide sur lame (ALT) avec soit du sang entier soit du sérum (41) a été développé pour la détection des agglutines spécifiques : l'antigène est une suspension dense de mycoplasmes marqués qui est mélangée avec une goutte de sang ou de sérum. Par manque de sensibilité, le test détecte seulement les animaux dans les stades précoces (par ex. la phase aiguë) de la maladie. Il devrait être utilisé seulement au niveau d'un troupeau. Un test d'agglutination sur latex qui est plus simple à interpréter que l'ALT a été développé (4).

Pour la PPCB, le test de FC et les ELISA peuvent être utilisés en dépistage et dans les programmes d'éradication, mais le test d'immuno-empreinte qui est très spécifique devrait être utilisé comme test de confirmation. Cependant, ce dernier test n'est pas adapté au dépistage de masse et peut être difficile à normaliser dans les pays avec des facilités limitées dans les laboratoires ; le test d'immuno-empreinte ne devrait être réalisée que dans un laboratoire de référence.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Depuis le début du XX^e siècle, beaucoup de vaccins contre la PPCB ont été décrits (par exemple des vaccins à germes inactivés et des vaccins hétérologues), mais aucun d'eux ne s'est avéré réellement satisfaisant. Aujourd'hui, les seuls vaccins couramment utilisés sont préparés avec des souches atténuées de *MmmSC*.

1. Gestion des semences

a) Caractéristiques de la semence

Deux souches sont utilisées pour la préparation de vaccins : la souche T1/44, une souche naturellement peu virulente isolée en 1951 par Sheriff et Piercy en Tanzanie et la souche T1sr (44, 46). Le 44^e passage sur œuf de la souche T1, nommée T1/44, est suffisamment atténué pour protéger les animaux sans réactions post-vaccinales sévères ; cependant, bien que rares de telles réactions peuvent toujours survenir. Leur fréquence est imprévisible. Avant une campagne de vaccination de masse, la sensibilité des races bovines devrait être évaluée. Il convient de noter que, administré par intubation, le vaccin peut induire des lésions de PPCB (28) ; cependant, comme le vaccin doit être injecté par voie sous-cutanée, ceci ne devrait pas créer de problème de maladie grave (22).

L'identité de la souche peut être vérifiée sur son profil de répartition d'une séquence d'insertion ou par un test PCR spécifique (25).

Le lot de semence primaire est conservée sous forme lyophilisée à -20 °C. Elle est en dépôt au laboratoire international du PANVAC de l'Unité Africaine.

b) Méthode de culture

Pour la production de vaccin, un système de lots de semence lyophilisée issus de cultures de semence primaire est utilisé, ces lots de semence sont conservés à -20 °C.

Les milieux utilisés pour les cultures de semence sont en général identiques à ceux utilisés pour la production. Cependant, il n'existe aucune condition préalable spécifique tant qu'ils garantissent une bonne croissance de la souche vaccinale.

Lors de cultures de vaccins en grand volume, pour éviter le risque d'un clonage par inadvertance, tout le contenant d'une ampoule de la semence vaccinale doit être inoculée directement dans un tube contenant du milieu de production. Un deuxième tube peut être ensemencé pour réaliser une dilution du précédent.

2. Méthode de fabrication

Les milieux utilisés pour la production de vaccin peuvent être légèrement différents des milieux utilisés pour l'isolement. Dans le cas de la production de vaccin, ce qui compte le plus n'est pas tant la vitesse de croissance que le titre final obtenu. En outre, les mycoplasmes récoltés doivent pouvoir supporter la lyophilisation sans une baisse excessive de titre.

Des exemples de milieu sont le milieu de Gourlay ou le milieu F₆₆ ; il est cependant possible d'apporter des modifications à ces milieux notamment par l'adjonction de tampon.

Les cultures pour la production d'un lot de vaccin ne doivent pas dépasser 3 passages successifs à partir de la semence. Un passage est défini comme une dilution au 1/100 d'une culture en phase exponentielle de croissance.

Par exemple : 0,5 ml d'une culture de la semence sont transférés dans 50 ml de milieu et, quand un trouble est observé, ces 50 ml sont ensemencés dans 5 000 ml de milieu ; quand le titre optimal est atteint, cette culture représente le produit final. Chaque fabricant de vaccin doit donc estimer la vitesse de croissance de la souche vaccinale dans le milieu utilisé afin d'établir la meilleure période pour la récolte.

Un produit stabilisant peut être ajouté aux cultures finales avant lyophilisation. Le fabricant doit s'assurer que la distribution dans les flacons est homogène et utiliser un lyophilisateur approprié afin d'obtenir des titres identiques dans tous les flacons à la fin de la lyophilisation.

3. Contrôle en cours de fabrication

Il est impératif de respecter les Bonnes pratiques de fabrication (BPF) afin d'éviter les contaminations à chaque étape de la production et de garantir la pureté du produit final.

Ainsi, un examen du milieu récolté en microscopie à contraste de phase permet aisément la détection des contaminations par des bactéries ou des champignons.

4. Contrôles des lots

a) Pureté et identité

Des milieux appropriés doivent être ensemencés avec des échantillons du produit final afin de vérifier sa pureté et l'absence de contamination avec des bactéries ou des champignons. Tous les milieux doivent restés stériles (35). Les tests de stérilité sont décrits au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

Il convient de vérifier aussi l'absence de contamination par d'autres mycoplasmes. Un test d'inhibition de croissance sur le produit final avec un sérum hyperimmun dirigé contre *MmmSC* (de préférence produit avec la souche T1/44) peut, par exemple, être réalisé. La présence de colonies de mycoplasmes entourées d'une zone d'inhibition doivent être suivie de l'identification de ces colonies pour éliminer la présence de mycoplasmes autres que ceux de la souche vaccinale.

L'identité de la souche vaccinale présente dans le produit final doit être garantie par le fabricant.

Par exemple, une épreuve de PCR spécifique peut être utilisée pour identifier les souches T1. De plus, la résistance à la streptomycine peut servir à différencier la souche T1/44 de la souche T1/sr.

b) Dénombrement

Le nombre minimum de mycoplasmes viables requis par dose vaccinale est de 10^7 , mais des titres plus élevés sont recommandés en raison de la baisse de titre observée entre la sortie de l'unité de production et l'injection aux animaux. Le dénombrement est réalisé après reprise du lyophilisat de vaccin avec le diluant recommandé pour la vaccination (et de préférence avec le diluant fourni par le fabricant). Les dénombrements doivent être mis en œuvre sur au moins 3 ampoules par lot. Le titre doit être estimé par une technique de titrage permettant une précision de ± 0.25 log. Un lot est accepté si 3 flacons choisis au hasard présentent un titre supérieur à la limite requise. Le fabricant doit garantir que le titre minimum est toujours présent jusqu'à la date de péremption si le produit est conservé dans des conditions de température adéquates.

c) Innocuité

Après reconstitution, le vaccin est inoculé en sous-cutané à 2 souris, en intrapéritonéal à 2 autres souris et en intrapéritonéal à 2 cobayes mâles. Aucun de ces animaux ne doit mourir dans le mois suivant et les cobayes ne doivent pas présenter de signe d'orchite. Des tests d'innocuité doivent être menés sur des bovins ou des zébus (au moins 2). Ceux-ci sont inoculés avec 10 doses vaccinales chacun et surveillés pour les réactions indésirables durant au moins 4 semaines.

d) Activité

Les tests d'activité ne sont pas réalisés en routine avec chaque lot car il n'existe pas d'animaux de laboratoire qui permettant de réaliser ces tests à un coût acceptable. Les tests d'activité sur bovins ne sont pas non plus réalisés en raison de leur coût élevé. En effet, pour obtenir des taux de protection statistiquement significatif, il conviendrait d'utiliser au moins 50 animaux.

L'activité du produit final est garantie par l'utilisation d'une semence primaire dont l'origine est connue et pour laquelle le test d'activité a déjà été réalisé en suivant strictement les protocoles de production normalisés (et en évitant les passages multiples) et en vérifiant que les titres finaux sont corrects.

e) Durée de l'immunité

La souche T1/44 confère une protection d'approximativement 1 an (21), mais celle conférée par la souche T1sr peut ne pas excéder 6 mois. Une conversion sérologique (test de FC) apparaît chez quelques animaux. Les anticorps disparaissent 3 mois après la vaccination.

f) Stabilité

Des dénombrements périodiques du vaccin stocké, permettent d'estimer la date de péremption. Les vaccins lyophilisés doivent être conservés à -20°C . A cette température la durée de stockage est au moins de 1 an (35), la viabilité peut être conservée pendant des années sans perte de titre, ce qui permet la constitution de stocks d'urgence. Les titres de ces stocks doivent évidemment être contrôlés régulièrement.

g) Agents de conservation

Pour la lyophilisation, des agents de conservation peuvent être ajoutés. Par exemple, du lait écrémé en poudre est ajouté : 45 g/litre de milieu de culture. Une solution saline normale est de préférence utilisée pour reconstituer le vaccin (9 g/l). Une solution molaire de sulfate de magnésium (248 g par litre) à température ambiante peut également être utilisée. Cette solution molaire protège les mycoplasmes de l'inactivation par la chaleur (35). La pureté des sels utilisés est importante. Quand on utilise un diluant avec du sulfate de magnésium pour la reconstitution du vaccin, il convient de vérifier de s'assurer que le pH du produit final de tombe pas en dessous de 6,5 car cela pourrait entraîner une chute du titre (26).

h) Précautions d'emploi et mise en garde

Les procédures d'utilisation sur le terrain et de reconstitution des vaccins lyophilisés ont été décrits par Provost *et al.* (35).

De fortes réactions peuvent apparaître lorsque des animaux infectés sont vaccinés, comme cela s'est produit récemment suite à des campagnes de vaccination d'urgence dans l'est de l'Afrique. Les réactions habituellement apparaissent dans les 2 à 3 jours. Des réactions locales peuvent aussi apparaître au site de l'injection après 2 à 3 semaines avec la souche T1/44. Ces réactions sont connues comme une « réaction de Willens » qui consiste en un œdème invasif conduisant à la mort si un traitement par un antibiotique tel que la tétracycline ou la tylosine n'est pas entrepris. La souche T1sr est totalement dépourvue de pouvoir pathogène résiduel, elle constitue une alternative à la souche T1/44 bien que la durée d'immunisation soit plus courte. Des doutes ont été émis quant à l'efficacité de la souche T1sr pour le contrôle des foyers en Afrique de Sud et ont conduit à sa suspension (40).

La sensibilité globale d'une population bovine donnée devrait faire l'objet d'un test préliminaire par vaccination de groupes « échantillon » (35).

5. Contrôles du produit fini

Ces tests doivent être réalisés après reconstitution d'un ensemble d'au moins 5 ampoules du vaccin lyophilisé dans le diluant recommandé.

a) Innocuité

Des tests d'innocuité doivent être entrepris sur des bovins ou des zébus ; pour les procédures voir Section C.4.c.

b) Activité

Ce test est réalisé selon le protocole décrit dans la section C.4.d. Du fait de la difficulté à reproduire expérimentalement la PPCB et compte tenu du coût de l'épreuve, un seul test d'activité est requis pour chaque lot de semence, pourvu que le titre soit satisfaisant et que les paramètres de la production n'aient pas été modifiés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABDO E.-M., NICLOLET J. & FREY J. (2000). Antigenic and genetic characterization of lipoprotein LppQ from *Mycoplasma mycoides* subs. *mycoides* SC. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **7**, 588–595.
2. AL-AUBAIDI J.M. & FABRICANT J. (1971). Characterization and classification of bovine mycoplasma. *Cornell Vet.*, **61**, 490–518.
3. AMANFU W., SEDIADIE S., MASUPU K.V., BENKIRANE A., GEIGER R. & THIAUCOURT F. (1998). Field validation of a competitive ELISA for the detection of contagious bovine pleuropneumonia in Botswana. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **51**, 189–193.
4. AYLING R.D., RAGALLA J. & NICHOLAS R.A.J. (1999). A field test for detecting antibodies to *Mycoplasma mycoides* susp. *Mycoioides* SC using the latex slide agglutination test. In: *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnosis, Epidemiology And Molecular Genetics*, Volume 3, Stipkovitz L., Rosengarten R. & Frey J., eds. EUR 18756 EC. Brussels, Belgium, 155–158.
5. BASHIRUDDIN J. B., NICHOLAS R. A. J., SANTINI F. G., READY R. A., WOODWARD M.J. & TAYLOR T. K. (1994). Use of the polymerase chain reaction to detect *Mycoplasma* DNA in cattle with contagious pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, **134**, 240–241.
6. BASHIRUDDIN J.B., SANTINI F.G., SANTIS P.D. & NICHOLAS R.A.J (1999). Detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* in tissues from an outbreak of contagious bovine pleuropneumonia by culture, immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *Vet. Rec.*, **145**, 271–274.
7. BELLINI S., GIOVANNINI A., DI FRANCESCO C., TITTARELLI M. & CAPORALE V. (1998). Sensitivity and specificity of serological and bacteriological tests for contagious bovine pleuropneumonia. *Rev. sci. tech. OIE Int. Epiz.*, **17**, (3), 654–659.
8. BROCCHI E., GAMBA D., POUMARAT F., MARTEL J.L. & DE SIMONE F. (1993). Improvements in the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia through the use of monoclonal antibodies. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12**, 559–570.
9. BRUDERER U., REGALLA J., ABDO EL-M., HUEBSCHLE O.J. & FREY J. (2002). Serodiagnosis and monitoring of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) with an indirect ELISA based on the specific lipoprotein LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet. Microbiol.*, **84** (3), 195–205.
10. CHENG X., NICOLET J., POUMARAT F., REGALLA J., THIAUCOURT F. & FREY J. (1995). Insertion element IS1296 in *Mycoplasma mucoioides* subsp. *mycoides* small colony identifies a European clonal line distinct from African and Australian strains. *Microbiol.*, **141**, 3221–3228.
11. COTTEW G.S., BREARD A., DAMASSA A.J., ERNO H., LEACH R.H., LEFEVRE P.C., RODWELL A.W. & SMITH G.R. (1987). Taxonomy of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Israel J. Med. Sci.*, **23**, 632–635.
12. DEDIEU L., MADY V. & LEFEVRE P.C. (1994). Development of a selective polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (contagious bovine pleuropneumonia agent). *Vet. Microbiol.*, **42**, 327–339.
13. FERRONHA M.H., NUNES PETISCA J.L., SOUSA FERREIRA H., MACHADO M., REGALLA J. & PENHA GONCALVES A. (1990). Detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* immunoreactive sites in pulmonary tissue and sequestra of bovines with contagious pleuropneumonia. In: *Contagious Bovine Pleuropneumonia*. Regalla J., ed. Doc. No. EUR 12065 EN of the Commission of the European Communities, Luxembourg, 17–25.
14. FREUNDT E.A., ERNO H. & LEMCKE R.M. (1979). Identification of mycoplasmas. In: *Methods in Microbiology*, Vol. 13, Bergen T. & Norris J.R., eds. Academic Press, London, UK, 377–434.

15. GAURIVAUD P., PERSSON A., GRAND D.L., WESTBERG J., SOLSONA M., JOHANSSON K.E. & POUMARAT F. (2004). Variability of a glucose phosphotransferase system permease in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony. *Microbiology*, **150**, 4009–4022.
16. GONÇALVES R., REGALLA J., NICOLET J., FREY J., NICHOLAS R., BASHIRUDDIN J., DE SANTIS P. & PENHA GONÇALVES A. (1998). Antigen heterogeneity among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates: discrimination of major surface proteins. *Vet. Microbiol.*, **63**, 13–28.
17. GORTON T.S., BARNETT M.M., GULL T., FRENCH R.A., LU Z., KUTISH G.F., ADAMS L.G. & GEARY S.J. (2005). Development of real-time diagnostic assays specific for *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony. *Vet. Microbiol.*, **111**, 51–58.
18. GRIFFIN R.M. (1965). A gel diffusion test for contagious bovine pleuropneumonia. *J. Comp. Pathol.*, **75**, 223–231.
19. HOUSHAYMI B, MILES R.J. & NICHOLAS R.A.J. (1997). Oxidation of glycerol differentiates African from European isolates of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (small colony). *Vet. Rec.*, **140**, 182–183.
20. HUBSCHLE O., GODINHO K. & NICHOLAS R.A.J. (2004). Danofloxacin treatment of cattle affected by CBPP. *Vet. Rec.*, **155**, 404.
21. HUDSON J.R. (1971). Contagious Bovine Pleuropneumonia. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Agricultural Studies No. 86. FAO, Rome, Italy.
22. HUBSCHLE O., LELLI R., FREY J. & NICHOLAS R.A.J. (2002). Contagious bovine pleuropneumonia and vaccine strain T1/44. *Vet. Rec.*, **150**, 615.
23. LE GOFF C. & THIAUCOURT F. (1998). A competitive ELISA for the specific diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Vet. Microbiol.*, **60**, 179–191.
24. LORENZON S., ARZUL I., PEYRAUD A., HENDRIKX P. & THIAUCOURT F. (2003). Molecular epidemiology of CBPP by multilocus sequence analysis of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains. *Vet. Microbiol.*, **93**, 319–333.
25. LORENZON S., DAVID A., NADEW M., WESONGA H. & THIAUCOURT F. (2000). Specific PCR identification of the T1 vaccine strains for contagious bovine pleuropneumonia. *Mol. Cell. Probes*, **14**, 205–210.
26. MARCH J.B. (2004). Improved formulations for existing CBPP vaccines – recommendations for change. *Vaccine*, **22**, 4358–4364.
27. MARTEL J.L., NICHOLAS R., NOORDUIZEN J., PINI A. & REGALLA J. (2004). Diagnostic tests for contagious bovine pleuropneumonia. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Commission of the European Community. (In Press).
28. MBULU R.S., TJIPURA-ZAIRE G., LELLI R., FREY J., PILO P., VILEI E.M., METTLER F., NICHOLAS R.A. & HUEBSCHLE O.J. (2004). Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) caused by vaccine strain T1/44 of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet. Microbiol.*, **98**, 229–234.
29. MISEREZ R., PILLOUD T., CHENG., NICOLET J., GRIOT C. & FREY J. (1997). Development of a sensitive nested PCR method for the specific detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Mol. Cell. Probe*, **11**, 103–111.
30. NIANG M., DIALLO M., CISSE O., KONE M., DOUCOURE M., ROTH J.A., BALCER-RODRIGUES V. & DEDIEU L. (2006). Pulmonary and serum antibody responses elicited in zebu cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC by contact exposure. *Vet. Res.*, **37**, 733–744.
31. PERSSON A., PETTERSSON B., BOLSKE G. & JOHANSSON K.-E. (1999). Diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia by PCR-laser Induced fluorescence and PCR-restriction endonuclease analysis based on the 16S rRNA genes of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3815–3821.
32. PETTERSSON B., LEITNER T., RONAGHI M., BOLSKE G., UHLEN M. & JOHANSSON K.E. (1996). Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. *J. Bacteriol.*, **17**, 4131–4142.

33. POUMARAT F., PERRIN B. & LONGCHAMBON D. (1991). Identification of ruminant mycoplasma by dot-immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet. Microbiol.*, **29**, 329–338.
34. PROVOST A. (1972). Recherches immunologiques sur la péripleumonie. XIV. Description de deux techniques applicables sur le terrain pour le diagnostic de la maladie. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **25**, 475–496.
35. PROVOST A., PERREAU P., BREARD A., LE GOFF C., MARTEL J.L. & COTTEW G.S. (1987). Péripleumonie contagieuse bovine. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **6**, 565–624.
36. SANTINI F.G., VISAGGIO M., FARINELLI G., DI FRANCESCO G., GUARDUCCI M., D'ANGELO A.R., SCACCHIA M. & DI GIANNATALE E. (1992). Pulmonary sequestrum from *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides* SC in a domestic buffalo; isolation, anatomo-histopathology and immuno-histochemistry. *Veterinaria Italiana*, **4**, 4–10.
37. SRIVASTAVA N.C., THIAUCOURT F., SINGH V.P., SUNDER J. & SINGH V.P. (2000). Isolation of *Mycoplasma mycoides* small colony type from contagious caprine pleuropneumonia in India. *Vet. Rec.*, **147**, 520–521.
38. TAYLOR T.K., BASHIRUDDIN J.B. & GOULD A.R. (1992). Relationships between members of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by DNA probes and sequence analysis. *Int. J. Syst. Bact.*, **42**, 593–601.
39. THIAUCOURT F., LORENZON S., DAVID A. & BREARD A. (2000). Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by sequencing of a putative membrane protein gene. *Vet. Microbiol.*, **72**, 251–268.
40. TULASNE J.J., LITAMOI J.K., MOREIN B., DEDIEU L., PALYA V.J., YAMI M., ABUSUGRA I., SYLLA D. & BENSALD A. (1996). Contagious bovine pleuropneumonia vaccines: the current situation and the need for improvement. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15**, 1373–1391.
41. TURNER A.W. & ETHERIDGE J.R. (1963). Slide agglutination tests in the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia. *Aust. Vet. J.*, **39**, 445–451.
42. VILEI E.M., ABDO E.-M., NICOLET J., BOTELHO A., GONCALVES R. & FREY J. (2000). Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* susp. *mycoides* SC. *Microbiol.*, **146**, 477–486.
43. VILEI E.M. & FREY J. (2001). Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* susp. *mycoides* SC: Its impact on H₂O₂ production and virulence. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 85–92.
44. WESONGA H.O. & THIAUCOURT F. (2000) Experimental studies on the efficacy of T1sr and T1/44 vaccine strains of *MmmSC* against a field isolate causing contagious bovine pleuropneumonia in Kenya – Effect of a revaccination. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **53**, 313–318.
45. WESTBERG J., PERSSON A., HOLMBERG A., GOESMANN A., LUNDEBERG J., JOHANSSON K.E., PETTERSSON B. & UHLEN M. (2004). The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Res.*, **14**, 221–227.
46. YAYA A., GOLSIA R., HAMADOU B., AMARO A. & THIAUCOURT F. (1999). Essai comparatif d'efficacité des deux souches vaccinales T1/44 et T1sr contre la péripleumonie contagieuse bovine. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **52**, 171–179.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la Péripleumonie contagieuse 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).

DERMATOPHILOSE

RÉSUMÉ

La dermatophilose (ou streptothricose) est une dermatite exsudative qui affecte principalement les bovins, les moutons et les chevaux, mais également les chèvres, les chiens, les chats, les reptiles, et occasionnellement l'homme. Les formes graves de la maladie rencontrées chez les ruminants sont favorisées par les effets immunomodulateurs induits lors de l'infestation par la tique Amblyomma variegatum.

Le diagnostic de laboratoire est basé sur la démonstration de la bactérie Dermatophilus congolensis dans les prélèvements de peau ou d'organes. Il est rare que d'autres organes que la peau soient affectés.

Identification de l'agent pathogène : *Dermatophilus congolensis affecte l'épiderme, provoquant la formation de croûtes. La bactérie peut être mise en évidence dans les frottis de croûtes émulsifiées ou ramollies dans de l'eau, ou sur des calques sur lames de la base de croûtes fraîchement arrachées. L'organisme est Gram positif, mais sa morphologie est plus aisément appréciée dans les frottis colorés au Giemsa. Dans les frottis colorés, l'organisme apparaît sous forme de filaments ramifiés contenant de multiples rangées de cocci. Cette morphologie caractéristique a une valeur diagnostique. Dans des croûtes humides ou infectées secondairement, seules des cocci libres peuvent être présentes ce qui rend nécessaire la coloration par immunofluorescence. Dermatophilus congolensis peut être détecté dans les coupes histologiques par coloration au Giemsa ou par immunofluorescence. Dermatophilus cheloniae peut être trouvé chez les cobras, les crocodiles et les tortues.*

L'isolement de D. congolensis à partir de croûtes fraîchement prélevées est direct, mais l'organisme est facilement surinfecté par d'autres bactéries. Quand la culture est effectuée à partir de lésions contaminées, des techniques spéciales impliquant la filtration, le chimiotaxisme, ou des milieux sélectifs sont nécessaires.

La démonstration et l'identification de D. congolensis par immunofluorescence est une méthode de diagnostic fiable et très sensible, mais elle requiert de la part des laboratoires la préparation d'antisérums qui ne sont pas disponibles commercialement. Bien que des réactions croisées avec Nocardia spp. aient été rapportées, l'intensité de fluorescence reste faible. Idéalement, il faut utiliser un anticorps monoclonal spécifique de D. congolensis. Une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) a été mise au point.

Épreuves sérologiques : *diverses épreuves sérologiques ont été utilisées dans des études d'épidémiologie et de pathogénie de la dermatophilose. Des anticorps peuvent être détectés chez la plupart des ruminants en bonne santé, toutefois des taux élevés associés à une infection clinique ont une valeur diagnostique.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *en dépit de l'identification de plusieurs facteurs de virulence de l'agent pathogène, aucun vaccin n'est disponible pour le moment.*

A. INTRODUCTION

La dermatophilose (également connue sous le nom de streptothricose ou « lumpy wool disease » chez les moutons) est une dermatite exsudative qui affecte principalement les bovins, les moutons et les chevaux, mais également les chèvres, les chiens, les chats, de nombreux mammifères sauvages, les reptiles, et

occasionnellement l'homme. La dermatophilose est provoquée par la bactérie *Dermatophilus congolensis*, l'espèce-type du genre *Dermatophilus*, qui appartient à l'ordre des Actinomycétales. La dermatophilose est la maladie cutanée la plus commune chez les crocodiles en Australie où elle a un impact important sur l'élevage de cette espèce (2). Elle est causée par *Dermatophilus cheloniae* qui a été aussi isolé chez les cobras et les tortues.

Il existe de nombreuses variations dans l'expression clinique de la maladie et dans les parties du corps qui sont affectées. Typiquement, l'infection conduit à la formation de croûtes épaisses, mais dans certaines zones comme le périnée des ruminants et les paturons des chevaux, des lésions humides sur une peau plissée et épaissie peuvent survenir. Dans ces lésions les croûtes restent relativement fines. Lorsque les lésions sont exposées pendant de longues périodes à l'humidité, avec ou sans surinfection secondaire, des lésions exsudatives peuvent apparaître.

Les croûtes sont caractérisées par une alternance de couches de kératinocytes parakératosique envahies par des filaments bactériens et infiltrées par des neutrophiles et un exsudat séreux. Dans les coupes de tissus colorées, cela donne une apparence en « palissade ». Les filaments de *D. congolensis* restent confinés au niveau de l'épiderme et n'envahissent que rarement le derme.

Il n'est pas facile de reproduire expérimentalement la dermatophilose aiguë extensive. *Dermatophilus congolensis* n'est pas très pathogène et une combinaison de facteurs est nécessaire pour que se développent des lésions cliniques. La malnutrition, des pluies abondantes et des traumatismes mécaniques ont été impliqués comme facteurs favorisant la maladie. Cependant, dans les régions où la dermatophilose a un impact économique important (en Afrique occidentale et centrale ainsi que dans certaines îles des Caraïbes), le facteur de risque majeur est l'infestation par la tique *Amblyomma variegatum*. Une maladie grave pourrait être induite par les effets immunomodulateurs de la salive sécrétée lors de la morsure des tiques (1), mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas élucidés. La sensibilité à la dermatophilose est aussi influencée par la génétique des races de ruminants, les animaux originaires des régions tempérées, spécialement ceux des races laitières, sont très sensibles quand ils sont introduits dans des régions à risque.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

a) Examen microscopique

Le diagnostic est usuellement posé par la démonstration de l'agent causal dans les croûtes ou dans les exsudats présents sous les lésions croûteuses. L'organisme a une morphologie caractéristique au microscope – il est septé, les ramifications filamenteuses se divisent transversalement et longitudinalement pour former des rubans constitués de plusieurs rangées de coques sphériques ou ovoïdes, d'un diamètre de 0,5 µm. Cet aspect a une valeur diagnostique si au moins 4 rangées transversales de coques sont observées dans les préparations colorées. Cependant, ces formations peuvent être détruites pendant la préparation de frottis si le matériel est étalé trop vigoureusement sur la lame.

Des calques peuvent être effectués à partir de la surface inférieure concave et humide des croûtes fraîchement prélevées. Des frottis épais peuvent être préparés à partir de croûtes émulsionnées dans de l'eau distillée stérile. Les croûtes peuvent éventuellement être trempées une nuit dans de l'eau distillée ou une solution saline stérile afin de les hydrater suffisamment pour que la surface inférieure puisse servir à effectuer des calques en appliquant fermement cette surface sur une lame de microscope. Les frottis sont alors séchés à l'air, fixé à la chaleur ou par immersion dans du méthanol pendant 5 min, et colorés. Les organismes sont facilement colorés par le carbol fushine ou le bleu de méthylène dilués, mais la coloration de Gram ou une solution au 1/10 de Giemsa pendant 30 min, sont préférables pour les identifier dans les frottis épais. Dans ce cas, *D. congolensis* à la coloration foncée contraste avec les kératinocytes et les neutrophiles contre-colorés en rose. La coloration de Gram ne donne pas de résultats aussi bons que le Giemsa car elle peut sur-colorer le fond et ne pas révéler correctement les formations en rubans de coques.

Les croûtes humides et surinfectées secondairement ne contiennent souvent que quelques rares filaments et les organismes peuvent ne pas se colorer positivement au Gram. Dans un tel matériel, les coques ne peuvent pas être différenciées des autres bactéries coccoïdes, et une coloration par immunofluorescence est nécessaire. Cependant, les sérums spécifiques pour immunofluorescence ne sont pas disponibles commercialement. Il faut utiliser des frottis fins, fixés à la chaleur. Dans les cas difficiles et quand l'infection d'organes autres que la peau est suspectée, l'examen histopathologique de biopsies ou de matériel d'autopsie coloré au Giemsa ou par immunofluorescence est conseillé.

L'aspect typique des lésions et la morphologie caractéristique de l'organisme dans les frottis de dermatophilose bovine rendent la culture inutile dans la majorité des cas. Cependant, dans les rares cas où

les frottis colorés au Giemsa ne donnent pas de résultat définitif, la confirmation peut être apportée par isolement en culture. La culture est effectuée sur gélose au sang incubée à 37 °C. La croissance est accélérée dans des conditions de micro-aérophilie. Des colonies rugueuses, généralement hémolytiques, de colorations jaunes grises, d'environ 1 mm de diamètre apparaissent après 24 h. L'incubation à l'air produit des colonies ponctuelles d'aspect similaire qui atteignent une taille de 1 mm après 48 h. Les colonies rugueuses sont formées par les filaments, mais la culture continue à l'air stimule la production de coques. Les colonies prennent alors un aspect lisse, de couleur jaunâtre le plus souvent. Les coques sont mobiles quand elles sont prélevées dans les cultures jeunes. Les colonies doivent être différenciées de *Nocardia* spp. et de *Streptomyces* spp. chez lesquels les filaments ne se fragmentent jamais en multiples rangs de coques mobiles.

b) Culture

Pour l'isolement, le matériel infectieux peut être étalé directement à partir de la surface inférieure humide de croûtes non contaminées fraîchement prélevées, ou de suspensions de croûtes. Cependant, *D. congolensis* ayant une croissance lente, la culture peut rapidement être envahie par d'autres contaminants bactériens. Il est alors nécessaire d'utiliser des techniques d'isolement spécifiques. En général, des coques libres, mobiles ou non, sont présentes dans les suspensions de matériel. La filtration à travers une membrane de 0,45 µm est généralement suffisante pour réduire ou éliminer les contaminants et rendre l'isolement possible à partir du filtrat comme décrit ci-avant. La méthode de Haalstra (4) peut également être utilisée. De petits fragments de croûtes sont placés dans un flacon bijou contenant 1 ml d'eau distillée stérile et laissés à température ambiante pendant 3 à 4 h. La bouteille ouverte est ensuite placée pendant 15 min en atmosphère enrichie en CO₂. La surface du liquide est alors prélevée à l'anse de platine et mise en culture. La méthode est basée sur le relargage de cocci de *D. congolensis* à partir des croûtes et de leur chimiotactisme positif pour les atmosphères enrichies en dioxyde de carbone. Un milieu sélectif constitué de gélose au sang contenant 1 000 unités/ml de polymyxine B peut également être utilisé et efficace contre les contaminants sensibles à cet antibiotique.

c) Méthodes immunologiques

L'immunofluorescence est la technique immunologique la plus fiable et la plus sensible pour l'identification des antigènes de *D. congolensis* et le diagnostic de dermatophilose à partir de frottis ou de tissus. Des anticorps polyclonaux peuvent être préparés sur animaux par les techniques de référence en la matière. Une réactivité croisée avec certaines souches de *Nocardia* spp. est cependant possible. L'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques (5) est préférable. Cependant, les anticorps monoclonaux n'ont pas été largement distribués ni validés par des tests inter-laboratoires. Les colorations sont effectuées sur frottis minces ou calques de croûtes sur lames. Des échantillons positifs et négatifs connus doivent toujours être utilisés comme témoins.

d) Techniques de détection de l'acide nucléique

En l'absence de données suffisantes sur la séquence du génome, des techniques d'amplification au hasard de l'ADN polymorphique (RAPD pour *randomly amplified polymorphic DNA*) et d'électrophorèse en gel par champs pulsés (PGFE pour *pulsed-field gel electrophoresis*) ont été utilisées et se sont révélées utiles pour le typage moléculaire de *D. congolensis* (7). Un gène de la céramidase alcaline a été cloné à partir d'un fragment de RAPD et une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisant des amorces préparées à partir de la séquence nucléotidique de ce gène a donné un amplicon avec l'ADN de *D. congolensis*. Aucun produit d'amplification n'a été obtenu avec *M. bovis*, *C. propinquum* et *D. chelonae*, ce qui permet d'envisager une utilisation pour le diagnostic ou la détection de *D. congolensis* (3). Pour confirmer la présence de *D. congolensis*, on peut aussi utiliser, de manière alternative, une séquence de l'ADNr 16S obtenue après amplification.

2. Épreuves sérologiques

Le diagnostic clinique est en général effectué par les méthodes décrites précédemment plutôt que par sérologie. Des traces d'anticorps peuvent être détectées chez la plupart des ruminants même en bonne santé, mais les taux augmentent après une infection clinique. Les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) ont démontré leur sensibilité et leur aspect pratique. Des titres en anticorps supérieurs à un seuil de base peuvent être utilisés dans les études épidémiologiques pour identifier les animaux qui ont développé la maladie (9). Le test utilisant un antigène brut, des réactions croisées peuvent apparaître avec d'autres bactéries comme c'est le cas avec l'immunofluorescence. Pour le moment, l'ELISA n'a d'intérêt que dans le domaine de la recherche et n'est pas utilisé pour le diagnostic de routine. Les techniques sérologiques, qu'il s'agisse de l'ELISA ou de techniques plus anciennes comme l'hémagglutination ou l'électrosynérèse, ne sont pas utilisées dans le diagnostic de routine car la mise en évidence directe de la bactérie est aisée.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Dermatophilus congolensis produit plusieurs facteurs de virulence tels qu'une hémolysine, des phospholipases, des céramidases et des enzymes protéolytiques, qui pourraient faciliter la pénétration à travers la barrière épidermique et interagir avec la réponse inflammatoire de l'hôte. Ces facteurs de virulence sont des antigènes candidats pour des vaccins. Des recherches sur des vaccins afin de prévenir la dermatophilose ont été menées (6, 10) mais, à l'heure actuelle, aucun vaccin n'est disponible. Les recherches dans ce domaine sont bloquées par l'impossibilité de reproduire expérimentalement la maladie et le manque de connaissances sur l'immunité cutanée. L'accent a donc été mis sur le contrôle des tiques et l'identification de marqueurs génétiques de résistance ou de sensibilité avec des résultats prometteurs chez les bovins (8).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AMBROSE N., LLOYD D.H. & MAILLARD J.C. (1999). Immune responses to *Dermatophilus congolensis* infections. *Parasitol. Today*, **15**, 295–300.
2. BUENIAJE G.N., LADDS P.W. & MARTIN Y. (1998). Pathology of skin disease in crocodiles. *Aust. Vet. J.*, **76**, 357–363.
3. GARCIA-SANCHEZ A., CERRATO C., LARRASA J., AMBROSE C.N., PARRA A., ALONSO J.M., HERMOSO-DE-MENDOZA M., REY J.M. & HERMOSO-DE-MENDOZA J. (2004). Identification of an alkaline ceramidase gene from *Dermatophilus congolensis*. *Vet. Microbiol.*, **99**, 67–74.
4. HAALSTRA R.T. (1965). Isolation of *Dermatophilus congolensis* from skin lesions in the diagnosis of streptothricosis. *Vet. Rec.*, **77**, 824–825.
5. HOW S.J., LLOYD D.H. & LIDA J. (1988). Use of a monoclonal antibody in the diagnosis of infection by *Dermatophilus congolensis*. *Res. Vet. Sci.*, **45**, 416–417.
6. HOW S.J., LLOYD D.H. & SANDERS A.B. (1990). Vaccination against *Dermatophilus congolensis* infection in ruminants: prospects for control. In: *Advances in Veterinary Dermatology*, Volume 1, Von Tscharner C. & R.E.W. Halliwell, eds. Bailliere Tindall, London UK.
7. LARRASA J., GARCIA-SANCHEZ A., AMBROSE C.N., PARRA A., ALONSO J.M., REY J.M., HERMOSO-DE-MENDOZA M. & HERMOSO-DE-MENDOZA J. (2004). Evaluation of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed field gel electrophoresis techniques for molecular typing of *Dermatophilus congolensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **240**, 87–97.
8. MAILLARD J.C., BERTHIER D., CHANTAL I., THEVENON, S., SIDIBE I., STACHURSKI F., BELEMSAGA D., RAZAFINDRAIBE H & ELSEN J.M. (2003). Selection assisted by a BoLA-DR/DQ haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. *Genet. Sel. Evol.*, **35**, 193–200.
9. MARTINEZ D., AUMONT G., MOUTOUSSAMY M., GABRIEL D., TATAREAU J.C., BARRE N., VALLEE F. & MARI B. (1993). Epidemiological studies on dermatophilosis in the Caribbean. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **46**, 323–327.
10. SUTHERLAND S.S. & ROBERTSON G.M. (1988). Vaccination against ovine dermatophilosis. *Vet. Microbiol.*, **18**, 285–288.

*
* *

LEUCOSE BOVINE ENZOOTIQUE

RÉSUMÉ

La leucose bovine enzootique (LBE) est une maladie des bovins adultes due à un rétrovirus, le virus de la leucose bovine (BLV pour Bovine Leukaemia Virus). Les bovins peuvent être infectés à n'importe quel âge, y compris au stade embryonnaire. La grande majorité des infections sont subcliniques, mais une partie des bovins (environ 30 %) de plus de 3 ans développent une lymphocytose persistante et une faible proportion développent des lymphosarcomes (tumeurs) dans différents organes internes. L'infection naturelle a aussi été décrite chez le buffle, le mouton et les capybaras. Les signes cliniques, s'ils existent, sont liés à la nature des organes infectés. Les bovins atteints de lymphosarcomes meurent invariablement, de manière brutale ou des semaines à des mois après l'apparition des symptômes.

Identification de l'agent pathogène : *le virus peut être isolé par culture in vitro de lymphocytes périphériques provenant d'animaux infectés, suivie d'une identification virale par microscopie électronique ou par détection des antigènes viraux dans le surnageant de culture. L'ADN proviral peut être détecté dans les lymphocytes périphériques ou dans les tumeurs par une amplification en chaîne par polymérase (PCR).*

Épreuves sérologiques : *les méthodes de détection des anticorps les plus souvent utilisées dans le monde sont l'immunodiffusion en gélose (IDG) pour les échantillons de sérum et les réactions immuno-enzymatiques (ELISA) pour les échantillons de sérum ou de lait. Ces épreuves sont à la base du succès des politiques d'éradication de la LBE dans plusieurs pays. D'autres épreuves, telles que les épreuves radio-immunologiques peuvent être utilisées. Plusieurs kits de diagnostic d'IDG ou d'ELISA sont disponibles dans le commerce.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *aucun vaccin contre le BLV n'est disponible.*

A. INTRODUCTION

L'étiologie des lymphosarcomes bovins est multiple, mais la seule cause clairement identifiée à ce jour est l'infection par un rétrovirus, le virus de la leucose bovine (BLV pour *Bovine Leukaemia Virus*), responsable de la leucose bovine enzootique (LBE). Le terme de leucose bovine sporadique (LBS) est réservé aux lymphomes thymiques et cutanés des jeunes animaux (veaux). Ils se définissent par rapport à l'âge des animaux atteints et la localisation des tumeurs. La ou les causes de la LBS n'ont pas été identifiées. Enfin, certains lymphosarcomes n'entrent pas dans le cadre des LBS et LBE, notamment le lymphome multicentrique du bovin adulte, d'incidence sporadique et d'étiologie inconnue. La terminologie leucose ou LBE est à réserver pour les lymphomes provoqués par une infection à BLV (12).

Bien que les animaux puissent être infectés par le BLV à tous les âges, les tumeurs (lymphosarcomes) sont principalement observées chez les bovins de plus de 3 ans. Les infections sont pour la plupart subcliniques, 30 à 70 % des animaux infectés développent une lymphocytose et 0,1 à 10 % des animaux infectés développent des tumeurs. Les signes cliniques dépendent de la localisation de la tumeur et peuvent inclure des perturbations digestives, de l'inappétence, de l'amaigrissement, une baisse de l'état général, une faiblesse généralisée, et quelquefois des symptômes nerveux. Une hypertrophie des nœuds lymphatiques superficiels et profonds est quelque fois détectée par palpation externe et exploration rectale. À l'autopsie, les nœuds lymphatiques et de nombreux organes apparaissent infiltrés par des cellules néoplasiques. Les organes les plus fréquemment atteints sont la caillette, l'oreillette droite, la rate, les intestins, le foie, les reins, le feuillet, les poumons et l'utérus. Une prédisposition génétique à la lymphocytose persistante, et peut être aussi au développement de tumeurs, a été mise en évidence. Des résultats contradictoires suggèrent que le BLV serait responsable d'une immunodépression ainsi que d'une augmentation du taux de réforme des animaux dans un troupeau. Une étude a

démontré que les élevages infectés par le BLV présentent une réduction de la production laitière (de 2,5 à 3 fois le niveau de production de l'élevage), une augmentation du nombre d'animaux abattus, et une plus grande sensibilité à d'autres maladies infectieuses, telles que les mammites, les diarrhées et pneumonies infectieuses (9). Par contre, l'effet de la LBE sur la fécondité est minime (10).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Le virus peut être détecté par mise en cultures de lymphocytes sanguins périphériques infectés. Le virus est présent dans les lymphocytes périphériques sanguins et dans les cellules tumorales à l'état de provirus qui s'intègre dans le génome des cellules infectées. Le virus est également rencontré dans la fraction cellulaire de nombreux fluides corporels (sécrétions nasales et bronchiques, salive, lait). La transmission naturelle se fait via les cellules infectées, par exemple lors de la parturition. La transmission indirecte (horizontale et/ou mécanique) se fait via le matériel infecté, principalement par les aiguilles de prélèvement sanguin contaminées, par le matériel de chirurgie et par les gants utilisés lors d'exploration rectale. La transmission horizontale, en l'absence de ces facteurs favorisants est généralement lente (15). Une transmission mécanique peut avoir lieu par les insectes hématophages, et notamment les tabanidés, dans les régions où ces vecteurs sont présents en grand nombre.

Bien que plusieurs espèces puissent être infectées par le BLV, l'infection naturelle ne se produit que chez les bovins (*Bos taurus* et *Bos indicus*), les buffles d'eau et les capybaras. Les moutons sont très sensibles lors d'infections expérimentales. Ils développent plus fréquemment des tumeurs et à un âge plus précoce que les bovins. Une réponse humorale persistante peut aussi être détectée après infections expérimentales chez le cerf, le lapin, le rat, le cobaye, le chat, le chien, le mouton, le singe rhésus, le chimpanzé, l'antilope, le cochon, la chèvre et le buffle.

Le BLV est très probablement présent en Europe depuis le XIX^e siècle. De là, il a gagné le continent américain dans la première moitié du XX^e siècle. Il aurait alors pu regagner l'Europe et être introduit pour la première fois dans d'autres pays, par importation d'animaux provenant d'Amérique du Nord (13). Plusieurs pays sont reconnus comme officiellement indemnes de LBE.

Des études ont été menées pour savoir si le BLV était capable de causer des affections chez l'homme, notamment via la consommation de lait provenant de vaches infectées. Il n'existe, jusqu'à présent, aucune preuve de transmission et il est maintenant généralement admis que le BLV ne présente pas de danger pour l'homme.

1. Identification de l'agent pathogène

Le BLV est un rétrovirus exogène qui appartient au genre *Delta Retrovirus* de la famille *Orthoretrovirinae*. Il est apparenté d'un point de vue structural et fonctionnel aux virus leucémogènes-T humains HTLV-1 et HTLV-2 (pour human T-lymphotropic virus 1 et 2). Les lymphocytes B sont la cible principale du virus (5, 12). La particule virale comprend essentiellement l'ARN génomique simple brin, la nucléoprotéine p12, la protéine de capsid (core) p24, la glycoprotéine transmembranaire gp30, la glycoprotéine d'enveloppe gp51 et plusieurs enzymes dont la transcriptase reverse. L'ADN proviral, qui est produit par transcription inverse de la plus grande partie du génome viral, s'intègre de manière aléatoire et persistante dans l'ADN nucléaire de la cellule, dans laquelle il persiste sans production permanente de virus. La culture de cellules infectées *in vitro*, le plus souvent par cocultivation de lymphocytes avec une lignée cellulaire indicatrice, permet la production de virus, et ce, d'autant plus facilement après stimulation par des mitogènes.

a) Isolement viral

À partir de 1,5 ml de sang périphérique récupéré sur EDTA (acide éthylène-diamine-tétra-acétique), les cellules mononuclées sanguines sont récupérées sur un gradient de densité ficoll/sodium metrizoate, puis cocultivées avec 2×10^6 cellules de poumons de veau fœtal (FBL pour *Fœtal bovine lung*) pendant 3 à 4 jours dans 40 ml de milieu essentiel minimum (MEM) supplémenté à 20 % de sérum de veau fœtal. Le virus induit la formation de syncytiums dans les cellules de FBL. Des cultures provisoires peuvent aussi être réalisées en cultivant les cellules mononuclées en l'absence de cellules FBL pendant 3 jours dans des plaques de culture cellulaire à 24 puits (14). La détection des antigènes p24 et p51 dans le surnageant des cultures cellulaires se fait par radio-immunologie (RIA), réaction immuno-enzymatique (ELISA), par détection immunologique sur membrane ou par immunodiffusion en gélose (IDG). La présence de particules de BLV ou du BLV-provirus peut être mise en évidence par microscopie électronique et/ou par amplification en chaîne par polymérase (PCR).

b) Amplification en chaîne par polymérase

L'utilisation de la technique PCR pour détecter le BLV a été décrite par plusieurs auteurs (3, 6, 17, 18, 21). Des amorces ont été désignées avec plus ou moins de succès pour amplifier les régions des gènes *gag*, *pol*

et *env*. Jusqu'à présent, la technique de PCR nichée, suivie par une détection des amplicons en gel d'électrophorèse, est la technique la plus rapide et la plus sensible. Cette méthode utilise des séquences d'amorces du gène *env* codant gp51. Ce gène est hautement conservé et le gène, et sa protéine, sont généralement détectables chez tous les animaux infectés pendant toute la durée de l'infection. La technique est cependant réservée à des laboratoires qui disposent de facilités pour la virologie moléculaire. De plus, les précautions usuelles mais aussi des procédures de contrôles d'amplification doivent être réalisées pour assurer la validité des résultats (voir les Chapitres 1.1.5., « Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses » et 1.1.7., « Les biotechnologies dans le diagnostic des maladies infectieuses et le développement des vaccins »).

La technique de PCR nichée est applicable à la détection du BLV chez l'individu, dans les conditions suivantes :

- chez de jeunes animaux possédant des anticorps d'origine maternelle ;
- lors de tumeurs, pour réaliser un diagnostic différentiel entre lymphomes infectieux et sporadiques ;
- à partir de tissus tumoraux prélevés sur des cas suspects dans les abattoirs ;
- lors d'infection précoce, avant l'apparition des anticorps dirigés contre le virus de la LBE ;
- lors de cas douteux ou faiblement positif à l'ELISA ;
- lors de détection systématique de bovins dans les stations de prétestage (avant introduction dans les centres d'insémination) ;
- chez les bovins utilisés pour la production de vaccins, pour valider leur statut négatif vis-à-vis du BLV.

La PCR n'est pas recommandée pour la détection virale à l'échelle du troupeau, mais elle peut être utilisée en tant qu'épreuve de confirmation, complémentaire à la sérologie.

- **Sensibilité et fiabilité**

- i) *Sensibilité analytique*

En théorie, la sensibilité de la PCR nichée est d'une molécule d'ADN. Cependant la sensibilité analytique réelle est quelque peu inférieure, entre 5 et 10 molécules d'ADN proviral par échantillon.

- ii) *Échantillons faux positifs*

La forte sensibilité de la PCR nichée peut être à l'origine de faux positifs, par contamination des échantillons négatifs (6). Pour minimiser ce problème, plusieurs procédures sont mises en place durant l'analyse, telles que l'utilisation de hottes à flux laminaire, l'utilisation de pièces séparées et dédiées à chaque étape de la méthode, l'utilisation de gants neufs et de tubes à ouverture spécifique pour chaque test individuel, la présence de témoins négatifs (eau), etc.

- iii) *Échantillons faux négatifs*

La sensibilité de l'épreuve est limitée par le fait que seule une faible proportion de lymphocytes périphériques est infectée. La présence d'inhibiteurs de la PCR nichée dans les échantillons peut entraîner des résultats faussement négatifs. Pour les identifier, au moins un témoin positif est utilisé pour chaque amplification. Un témoin interne est, de plus, ajouté dans chaque échantillon à tester. Il consiste en une molécule d'ADN modifiée qui est amplifiée avec les mêmes amorces que celles utilisées pour amplifier l'ADN-cible, mais qui génère un fragment d'amplification de taille différente qui peut être visualisé par migration sur gel d'agarose. L'amplification de l'ADN-cible recherché est favorisée par la faible concentration du témoin interne (2). Cependant, le fait que le témoin interne puisse entrer en compétition avec l'ADN-cible, rend nécessaire l'analyse de chaque échantillon en présence et en l'absence du témoin.

- **Préparation de l'échantillon**

Les lymphocytes périphériques sanguins sont triés et récupérés à partir de prélèvements sanguins sur EDTA par la méthode de séparation Ficoll-Paque. De manière alternative le buffy coat, ou même le sang total peuvent être utilisés, notamment si le sang a été congelé.

Les tumeurs ou d'autres tissus peuvent être homogénéisés dans une suspension à 10 %.

- **Extraction de l'ADN**

Pour obtenir une sensibilité optimale, l'ADN total des échantillons doit être préalablement extrait et purifié. Diverses méthodes de purification sont disponibles dans le commerce, telles que la méthode NucleoSpin (Macherey-Nagel) ou la méthode de chélation sur résine (Bio-Rad).

Des précautions particulières doivent être prises à chaque étape du test pour minimiser le risque de contaminations (6).

- Ajouter approximativement 100 µl de résine de chélation (Sigma C-7901 ou Chelex de Bio-Rad) par échantillon dans un tube eppendorf de 1,5 ml.
- Ajouter 100 µl d'échantillon et 10 µl de témoin interne au tube contenant la résine et mélanger l'ensemble (vortex).
- fermer les tubes eppendorf et les mettre à incuber entre 56 et 60 °C pendant 20 min.
- Vortexer les tubes pendant 10 s.
- Incuber les tubes à 98 °C pendant 8 à 10 min.
- Vortexer les tubes pendant 10 s et les placer immédiatement sur glace.
- Étape optionnelle : normaliser la quantité d'ADN de chaque échantillon (500 ng par réaction), par exemple, par la méthode de Beta-globine (21).
- Centrifuger les tubes à 15 000 **g** pendant 2 min.
- 5 µl de chaque échantillon sont utilisés pour l'amplification par PCR.

- **Méthode de PCR nichée**

- Sélection des amorces et séquences*

Plusieurs méthodes de détection par PCR de l'ADN proviral du BLV ont été décrites (3, 17, 18, 21). Un protocole de PCR dérivé de celui développé par Ballagi-Pordany *et al.* (6) est décrit en détail pour exemple. La région génomique du BLV à amplifier est contenue dans le gène *env* codant la gp51. Les séquences utilisées pour dessiner les amorces d'amplification sont disponibles dans la Banque ADN GenBank sous le numéro d'accès K02120. Les séquences des amorces sont :

Oligo	Séquence	Position dans K02120
OBLV1A	(5'-CTT-TGT-GTG-CCA-AGT-CTC-CCA-GAT-ACA-3')	5029
OBLV6A	(5'-CCA-ACA-TAT-AGC-ACA-GTC-TGG-GAA-GGC-3')	5442
OBLV3	(5'-CTG-TAA-ATG-GCT-ATC-CTA-AGA-TCT-ACT-GGC-3')	5065
OBLV5	(5'-GAC-AGA-GGG-AAC-CCA-GTC-ACT-GTT-CAA-CTG-3')	5376

Taille du produit de PCR^I : 440 paires de bases (pb) ; taille du produit de PCR^{II} : 341 pb ; taille du témoin interne : 761 pb.

- Mélanges réactionnels*

Les composants nécessaires à l'amplification sont mélangés (à l'exception des échantillons ADN et du témoin interne) avant de les distribuer dans les différents tubes de réaction. Un témoin négatif (eau bidistillée) pour 5 tubes d'échantillons et un témoin positif devront aussi être utilisés. Le volume total des mélanges est calculé en multipliant le volume indiqué/échantillon par le nombre total d'échantillons à tester (en y incluant les témoins) et en y ajoutant le nombre 1. La Taq polymérase est utilisée à la dilution 1/10 dans un pré-mélange.

Les échantillons d'ADN et le témoin interne¹ (2) doivent être ajoutés dans des pièces de laboratoire séparées, pour minimiser le risque de contamination : la première pièce pour la préparation de l'ADN et du témoin interne et la deuxième pièce pour les produits de la PCR^{II}.

- Réactifs à ajouter dans la pièce propre de laboratoire*

Le mélange peut être préparé à l'avance et stocké à 4 °C pendant 1 mois.

1 Disponible auprès du Dr S. Belák, Department of Virology, National Veterinary Institute, Box 585, Biomedical Centre, S-751 23, Uppsala, Suède.

Réactifs par réaction (conc.)	Réaction de PCR ^I	Réaction de PCR ^{II}
H ₂ O bidistillée (produit de référence)	21 µl	21 µl
10 × tampon de PCR (Perkin Elmer)	5 µl	5 µl
dNTP (10 mM)	4 × 1 µl	4 × 1 µl
Albumine bovine sérique (1 mg/ml)	5 µl	5 µl
<u>Amorces (10 pmol/µl):</u>		
OBLV1A	1,5 µl	–
OBLV6A	1,5 µl	–
OBLV3	–	1,5 µl
OBLV5	–	1,5 µl
Total:	38 µl	38 µl

Les réactifs suivants doivent être ajoutés, juste avant de démarrer la réaction de PCR.

Réactifs par réaction (conc.)	Réaction de PCR ^I	Réaction de PCR ^{II}
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl	5 µl
Taq polymérase (1 unit/reaction)	2 µl	2 µl
Huile minérale	2 gouttes	2 gouttes
Total:	45 µl	45 µl

b) Réactifs à ajouter dans la première pièce de laboratoire (ADN) ou la deuxième (PCR^{II})

Réactifs par réaction (conc.)	PCR ^I réaction	PCR ^{II} réaction
Echantillon d'ADN* (ou eau*)	5 µl	–
Produit de PCR ^I	–	5 µl
Total:	50 µl	50 µl

iii) *Étapes de la PCR*

Étapes de la PCR^I

5 ×	94 °C/45 s, 60 °C/60 s, 72 °C/90 s
30 ×	94 °C/45 s, 55 °C/60 s, 72 °C/90 s
1 ×	72 °C/420 s ≥ 20 °C

Étapes de la PCR^{II}

5 ×	94 °C/45 s, 58 °C/60 s, 72 °C/90 s
30 ×	94 °C/45 s, 53 °C/60 s, 72 °C/90 s
1 ×	72 °C/420 s ≥ 20 °C

iv) *Procédure de laboratoire*

Les réactifs de mélange de la PCR^I sont décrits à l'étape ii. Utiliser des gants et/ou un système d'ouverture de tubes spécifique, pour chaque tube lors de l'addition des échantillons d'ADN. Mettre les échantillons sur glace. Préchauffer le bloc de l'appareil PCR à 80 °C. Mettre les échantillons dans le thermobloc et démarrer le programme de la PCR^I (étape iii).

Les réactifs de mélange de la PCR^{II} sont décrits à l'étape ii. Utiliser des gants et/ou un système d'ouverture de tubes spécifique, pour chaque tube lors de l'addition des échantillons ADN de la PCR^I. Mettre les échantillons sur glace. Préchauffer le bloc de l'appareil PCR à 80 °C. Mettre les échantillons dans le thermobloc et démarrer le programme de la PCR^{II} (étape iii).

- **Électrophorèse sur gel d'agarose**

Placer les produits de la PCR^{II} dans la pièce d'électrophorèse. Charger environ 10 à 15 µl de l'échantillon avec 23 µl de tampon de charge dans un gel d'agarose à 2 %, contenant 0,01 % de bromure d'éthidium. L'électrophorèse est réalisée pendant 2 h à 90 mA dans du tampon 0,5x Tris/borate/EDTA (TBE). Pour calculer la taille des amplicons, un marqueur de poids moléculaire, contenant des bandes marquées de tailles connues et espacées de 100 pb, est recommandé. L'analyse des produits de PCR est réalisée sous éclairage UV.

- **Interprétation des résultats**

- i) *Échantillons positifs*

Les échantillons positifs doivent avoir un produit d'amplification de PCR à la taille attendue de 341 pb, identique à la taille du témoin positif.

- ii) *Échantillons négatifs*

Les échantillons négatifs ne doivent pas contenir de produits d'amplification de PCR à la taille attendue de 341 pb, mais le produit d'amplification du témoin interne à la taille attendue de 144 pb.

- iii) *Résultats douteux*

L'épreuve doit être recommencée si les témoins positifs (témoin interne ou témoin externe) donnent des résultats négatifs ou si les témoins négatifs (eau bidistillée) donnent des résultats positifs.

- **Épreuve de confirmation**

La confirmation de la détection du BLV peut être réalisée par séquençage des produits d'amplification de la PCR, par hybridation à une sonde spécifique ou par analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) (11).

2. Épreuves sérologiques

L'infection par le BLV chez les bovins est permanente et aboutit à un taux d'anticorps persistant chez l'animal infecté. Les anticorps sont détectables entre 3 et 16 semaines après l'infection. Les anticorps d'origine maternelle peuvent persister jusqu'à 6 à 7 mois. Il n'existe aucune méthode qui permette actuellement de différencier les anticorps colostraux des anticorps acquis après infection. L'infection active peut cependant être détectée par détection du provirus BLV par PCR. Les anticorps passifs protègent partiellement les veaux contre l'infection. Pendant la période de parturition, les vaches peuvent avoir des taux d'anticorps indétectables par IDG, à cause du transfert des anticorps circulants dans le colostrum. Par conséquent, lors d'utilisation de l'épreuve d'IDG, un résultat négatif sur sérum prélevé entre 2 et 6 semaines avant le part et 1 à 2 semaines après le part, ne peut pas être interprété et l'épreuve devrait être répétée. Cependant, l'épreuve d'IDG peut être utilisée à cette période sur le colostrum de première tétée.

Les anticorps les plus souvent détectés sont ceux dirigés contre les protéines gp51 et p24 du virus. La plupart des épreuves d'IDG et ELISA de routine détectent les anticorps dirigés contre gp51, dans la mesure où ils sont plus précoces d'apparition. Les techniques de réalisation de ces épreuves ont été publiées (7, 9). Les épreuves ELISA sont, en général, plus sensibles que celle d'IDG.

Des sérums de référence de l'OIE (positif et négatif) sont disponibles après irradiation sous forme lyophilisée auprès du Laboratoire de référence de l'OIE en Allemagne (voir le tableau dans la Partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Le calibrage de ces sérums est basé sur le nouveau sérum de référence accrédité de l'OIE, dénommé E05, et qui a été validé par différents tests IDG ou ELISA contre le sérum de référence précédent E4. Ces sérums peuvent être utilisés pour définir la sensibilité d'une technique ELISA.

a) Méthode immuno-enzymatique (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Des tests ELISA, indirects ou de blocage, peuvent être utilisés. Ils sont disponibles dans le commerce. Différents tests de diagnostic peuvent être nécessaires pour tester les échantillons de lait ou les échantillons sanguins. Certains tests ELISAs présentent une sensibilité suffisante pour être utilisés sur mélange d'échantillons. Les tests ELISA sont réalisés sur microplaques en phase solide. L'antigène viral BLV est adsorbé sur les microplaques directement ou indirectement, en utilisant un anticorps monoclonal ou polyclonal de capture. L'antigène est préparé à partir du surnageant de cultures de cellules infectées de façon persistante par le BLV. Des cellules de rein de fœtus d'agneau (FLK pour *Fœtal lamb kidney*) sont les plus communément utilisées pour les tests du commerce (20). Depuis 2004, une nouvelle lignée cellulaire, PO714, qui est indemne de toute autre infection virale et qui contient un provirus du sous-groupe belge, est disponible (4). L'antigène est utilisé à une dilution prédéterminée (par ex. : 1/10) dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS). Dans les kits de diagnostic, les plaques sont quelquefois vendues avec l'antigène pré-adsorbé. Certains conservateurs (additifs) peuvent être ajoutés aux

prélèvements de lait pour éviter qu'il tourne. Les échantillons avec additifs peuvent être conservés sans détérioration significative jusqu'à 6 semaines, s'ils sont à 4 °C.

- **Test ELISA indirect sur le lait**

La méthode suivante est décrite pour la détection d'anticorps dans un pool d'échantillons de lait.

- **Témoins**

Des laits témoins, fortement positif, faiblement positif et négatif, ainsi que des témoins de dilution doivent être réalisés pour chaque test. Le témoin fortement positif doit être préparé en diluant le sérum de référence positif de l'OIE (E05) au 1/25^e dans un lait négatif (dépourvu d'anticorps anti-BLV). Le témoin faiblement positif est préparé en diluant dans du lait négatif le sérum référence (E05), à raison de 25 fois le nombre de prélèvements individuels de lait utilisés pour réaliser le mélange à tester. Le lait utilisé pour diluer les témoins positifs ne doit pas être pasteurisé, il doit être écrémé et correctement conservé.

- **Exemple de méthode**

- Conservé les échantillons de lait dans un réfrigérateur jusqu'à formation définitive de la couche crémeuse (24 à 48 h). Alternativement, centrifuger les échantillons de lait à 2 000 tr/min pendant 10 min. Éliminer la couche crémeuse avant de réaliser le test.
- Pré-adsorber l'antigène du BLV et un antigène témoin négatif en alternance sur les colonnes des microplaques. Ajouter 100 µl de l'échantillon à 100 µl de tampon de lavage pour faire une dilution au 1/2. Ajouter le mélange dans 2 puits adsorbés avec l'antigène BLV et dans 2 puits adsorbés avec le témoin négatif.
- Couvrir la microplaque et mélanger sur agitateur.
- Incuber la plaque pendant 14 à 18 h à une température comprise entre 2 et 8 °C.
- Ajouter 300 µl de tampon de lavage à chaque puits et éliminer le tout. Puis ajouter 200 µl de tampon de lavage à chaque puits, agiter pendant 10 s et éliminer le liquide. Finalement, ajouter 300 µl de tampon de lavage à chaque puits, laisser tremper pendant 3 min et éliminer le liquide.
- Ajouter 200 µl par puits d'un conjugué dilué dans du tampon de lavage et constitué d'IgG anti-bovin couplée à la peroxydase de raifort purifiée par affinité. Incuber pendant 90 min à température ambiante.
- Laver la microplaque en ajoutant 300 µl de tampon de lavage par puits et en éliminant le liquide des puits. Rajouter 300 µl de tampon de lavage, laisser tremper pendant 3 min et éliminer le liquide des puits. Répéter les étapes vi et vii.
- Ajouter 200 µl/puits d'une solution d'ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid]) préchauffée à 25 °C et incuber la plaque 20 min à température ambiante dans le noir. Stopper la réaction par l'ajout dans chaque puits de 50 µl de la solution d'arrêt.

- **Lecture et interprétation des résultats**

Le lecteur de plaques est calibré et la densité optique (DO) est lue à 405 nm. Tous les puits des microplaques doivent être lus dans les 2 heures qui suivent l'addition de la solution d'arrêt. Pour chaque échantillon, la DO lue pour le puits contenant l'antigène témoin négatif est soustraite à celle obtenue pour le puits correspondant, contenant l'antigène BLV positif (Δ -DO). Pour chaque échantillon, une moyenne des 2 Δ -DO corrigées est réalisée. La même procédure est réalisée pour les 2 puits du témoin faiblement positif. La différence de Δ -DO entre les 2 puits témoins faiblement positifs doit être de moins de 0,1 unité d'absorbance.

Pour que le test soit validé, la valeur moyenne des Δ -DO du témoin faiblement positif doit être comprise entre 0,2 et 0,6 unités d'absorbance. La Δ -DO du témoin positif fort doit être supérieure à 1 unité d'absorbance. La Δ -DO du témoin négatif et du témoin des diluants doit être inférieure au seuil inférieur de la plage correspondant aux résultats non-interprétables.

Sous réserve d'avoir validé le test comme décrit précédemment :

- L'échantillon est positif si la Δ -DO est supérieure ou égale à la Δ -DO du témoin faiblement positif.
- Si la Δ -DO est égale ou inférieure à 75 % de la Δ -DO du témoin faiblement positif, le résultat est non interprétable.

Pour exemple, si la Δ -DO du témoin faiblement positif est de 0,4,
alors la limite inférieure des résultats non interprétables est de $0,4 \times 0,75 = 0,30$

la tranche des résultats ininterprétables est donc comprise entre 0,30 et 0,39 et les échantillons supérieurs ou égaux à 0,4 sont considérés comme positifs.

- iii) Les résultats sont négatifs si la Δ -DO est inférieure à la limite inférieure de la tranche des résultats non interprétables (< 0,30 dans l'exemple cité ci-dessus).

- **Test ELISA de blocage sur sérum**

La méthode suivante est décrite pour la détection d'anticorps sur sérum individuel ou sur sérum de mélange.

- **Protocole**

- i) *Adsorption de la plaque*

Adsorber l'anticorps de blocage anti-BLV, dilué dans du tampon d'absorption, au fond de chaque puits de la plaque, à raison de 100 µl/puits. Couvrir la plaque et l'incuber à 4 °C pendant 18 h. Réaliser un cycle classique de lavage consistant en 3 lavages successifs (remplir complètement les puits avec le tampon de lavage et laisser incuber pendant 3 min pour chaque lavage). Sécher la plaque. Ajouter l'antigène BLV, pré-dilué dans du tampon de lavage, à raison de 100 µl par puits, couvrir la plaque et laisser incuber pendant 2 h à 37 °C. Réaliser un cycle complet de lavage.

- ii) *Préparation et ajout des sérums à tester et des témoins*

Diluer les témoins négatifs et positifs au 1/2 dans du tampon de lavage et mettre 100 µl/puits, dans 4 puits par témoin utilisé. Pour tester des sérums de mélange, 80 sérums peuvent être mélangés, puis le mélange est dilué au 1/2 et ajouté dans 2 puits (100 µl/puits) par sérum de mélange testé. Les sérums individuels doivent être dilués au 1/100^e dans du tampon de lavage et la solution est ajoutée dans 2 puits (100 µl/puits) pour chaque échantillon de sérum. Après avoir ajouté l'ensemble des échantillons, couvrir la plaque et laisser incuber pendant 18 h à 4 °C. Réaliser ensuite un lavage rapide en remplissant les puits avec du tampon de lavage et en éliminant immédiatement le surnageant des puits.

- iii) *Préparation et ajout des conjugués et du substrat*

Ajouter de l'anticorps anti-BLV biotinylé et pré-dilué dans du tampon de lavage additionné de 10 % de sérum de veau fœtal, à chaque puits et à raison de 100 µl/puits. Couvrir la plaque et laisser incuber sous agitation lente pendant 1 h à 37 °C. Réaliser un cycle classique de lavage. Ajouter dans chaque puits 100 µl d'une solution d'un complexe avidine-peroxydase pré-dilué dans du tampon de lavage. Couvrir la plaque et laisser incuber pendant 30 min à 37 °C sous agitation. Réaliser un cycle classique de lavage. Ajouter 100 µl/puits de substrat (orthophénylamine diamine), couvrir la plaque et laisser incuber pendant 9 min dans le noir. Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl d'acide sulfurique 0,5 M dans chaque puits.

- **Lecture et interprétation des résultats**

Le lecteur de plaques est calibré et la densité optique (DO) est lue à 490 nm. Pour les lecteurs de plaques à double lecture optique, un filtre de référence (entre 620 et 650 nm) est utilisé. Les résultats sont lus dans les 60 min qui suivent l'addition de la solution d'arrêt.

La DO du témoin négatif doit être approximativement de $1,1 \pm 0,4$; si la densité est inférieure à 0,7, le temps d'incubation lors des manipulations de détection par colorimétrie de l'étape iii (préparation et ajout des conjugués et du substrat) doit être allongé. Inversement ce temps doit être raccourci si la DO est supérieure à 1,5. La DO du témoin positif doit être inférieure à 0,25 fois la DO du témoin négatif.

Un échantillon de sérum est positif lorsque la DO de chacun des 2 puits testés est inférieure ou égale à 0,5 fois la moyenne des DO des 4 puits témoins négatifs.

Un échantillon de sérum est négatif quand la DO de chacun des 2 puits testés est supérieure ou égale à 0,65 fois la moyenne des DO des 4 puits témoins négatifs.

Pour les échantillons dont les DO sont comprises entre 0,5 et 0,65 fois la moyenne des DO des 4 puits témoin négatifs, il est recommandé de tester de nouveau l'animal sur un échantillon de sérum prélevé un mois plus tard.

- **Sensibilité de l'ELISA**

La sensibilité de l'ELISA pour les pools d'échantillons de lait peut être estimée en utilisant les sérums de référence OIE faiblement positif et négatif. Les essais doivent donner un résultat positif avec le E05 dilué dans du lait séronégatif, à raison de plus de 250 fois le nombre de laits individuels utilisés pour le mélange (Directive UE 88/406). Par exemple, pour un mélange constitué de 60 laits, E05 doit être dilué à raison de

1/250 × 60, soit 1/15 000. Pour les échantillons individuels de lait, le sérum de référence OIE faiblement positif et dilué dans un lait négatif (E05 1/250) doit être positif.

Lors d'utilisation de sérums de mélange, le sérum de référence OIE E05 doit être positif à une dilution égale à 10 fois le plus grand nombre d'animaux inclus dans le mélange. Par exemple, pour un mélange de 50 sérums individuels, le sérum de référence OIE positif doit être positif lorsqu'il est dilué à raison de 1/500^e dans un sérum négatif. Dans les tests sur sérums individuels, le sérum de référence OIE positif E05 dilué 1/10 doit être positif à l'issue de l'épreuve.

b) Épreuve d'immunodiffusion en gélose (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

L'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) est spécifique mais peu sensible. Elle permet la détection d'anticorps anti-VLB sur sérum individuel. Elle n'est pas utilisable pour les échantillons de lait (à l'exception du colostrum de première tétée) en raison de son manque de spécificité et de sensibilité. L'épreuve d'IDG est simple d'utilisation et s'est montrée d'une grande utilité et d'une grande efficacité dans le cadre de programmes d'éradication de la LBE. Les sérums de référence sont inclus dans les kits de diagnostic commercialisés.

i) *Gel d'agar* : Une solution d'agar ou d'agarose à 0,8-1,2 % est préparée dans du tampon Tris 0,2 M, pH 7,2 contenant 8,5 % de NaCl. Une méthode consiste à dissoudre 24,23 g de Tris méthylamine dans un litre d'eau distillée et d'ajuster le pH de la solution à 7,2 avec du HCl 2,5 M (solution Tris/HCl). 85 g de chlorure de sodium sont ensuite dissous dans 250 ml de Tris/HCl, puis la solution est complétée à 1 litre avec de l'eau distillée. 8 g d'agarose sont ajoutés à la solution, qui est ensuite chauffée sous pression (cocotte minute) ou autoclavée à 4,55 kg/cm² pendant 10 min. Le mélange est ensuite aliquoté dans des tubes de 15 ml, qui peuvent être conservés jusqu'à 6 semaines environ à 4 °C.

ii) *Solution antigénique* : Elle doit obligatoirement contenir comme antigène la glycoprotéine gp51 du BLV. L'antigène est préparé en cultures cellulaires, comme les cellules fœtales d'agneaux (FLK pour *Fœtal lamb kidney*) infectées de manière persistante. Les cellules utilisées pour produire l'antigène viral doivent être indemnes des virus suivants : virus de la maladie des muqueuses/diarrhée virale bovine souches non-cytopathogènes rétrovirus bovin, virus de l'immunodéficience bovine (lentivirus) et virus syncytial bovin (spumavirus). Après 3 à 4 jours de culture à 37 °C, le milieu de croissance est remplacé par un milieu standard d'entretien. Les cellules sont détachées des supports et collectées après 7 jours, par trypsination classique (solution de trypsine/versène). La suspension cellulaire est ensuite récupérée par centrifugation à 500 *g* pendant 10 min. Le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de croissance et 30 % des cellules sont remises en culture, le reste étant éliminé. Tous les surnageants de culture sont collectés et concentrés de 50 à 100 fois, par différentes techniques disponibles. Ces techniques peuvent être la concentration dans des tubes type Visking immergés dans du polyéthylène glycol, la précipitation en sulfate d'ammonium suivie d'une ultracentrifugation ou la précipitation avec du polyéthylène glycol avec élimination des sels et séparation selon la taille sur colonne contenant des billes de polyacrylamide. La solution antigénique contient principalement la gp51, mais peut aussi contenir la p24 en moindre quantité.

La solution antigénique peut être calibrée et normalisée pour la glycoprotéine gp51 par titrage avec le sérum E05 de la manière suivante : des dilutions de 2 en 2 de la solution antigénique sont préparées. La plus forte dilution qui donne une ligne de précipitation équidistante entre le sérum E4 et l'antigène correspond à une unité. Deux unités de la solution antigénique sont utilisées dans l'épreuve.

iii) *Sérum de témoin positif* : le sérum de témoin positif provient d'un animal (bovin ou mouton) expérimentalement ou naturellement infecté. La ligne de précipitation formée doit être une ligne distincte nette située à mi-distance entre les puits contenant la solution antigénique et le sérum témoin. Une dilution du sérum donnant un signal faiblement positif doit aussi être incluse dans l'épreuve en tant qu'indicateur de sensibilité.

iv) *Sérum témoin négatif* : un sérum provenant d'un animal non infecté (bovin, mouton) est utilisé.

v) *Sérums pour l'épreuve* : les sérums de toute espèce animale sont utilisables.

• Protocole

i) Mélanger l'agar en le chauffant dans un bain-marie et le distribuer sur boîtes de Petri (15 ml d'agar par boîte de 8,5 cm de diamètre). Laisser refroidir les boîtes pendant 1 h à 4 °C avant de découper des puits dans l'agar. Un multi-poinçonneur est utilisé qui réalise 6 puits répartis aux angles d'un hexagone et un puits au centre de l'hexagone. Des puits de différentes dimensions peuvent être utilisés. Un prototype satisfaisant a été proposé, qui utilise des puits de 6,5 mm de diamètre avec 3 mm de distance entre les puits. Pour de meilleurs résultats, utiliser des boîtes d'agar fraîches, réalisées le jour même.

- ii) Placer la solution antigénique dans le puits central de l'hexagone. Placer les sérums à tester en alternance avec les sérums témoins positifs dans les puits extérieurs. Il doit y avoir un témoin par boîte, constitué d'un profil prototype contenant du sérum positif, du sérum faiblement positif et du sérum négatif à la place des sérums à tester.
- iii) Les boîtes sont maintenues à température ambiante (20 à 27 °C) dans une chambre humide et lues à 24, 48 et 72 h.
- iv) *Interprétation des résultats* : un sérum est positif s'il forme une ligne de précipitation spécifique avec la solution antigénique et une ligne d'identité avec le sérum témoin positif. Un sérum est négatif s'il ne forme pas de ligne spécifique de précipitation avec la solution antigénique et s'il n'incurve pas la ligne du témoin positif. Des lignes non-spécifiques peuvent apparaître. Elles ne doivent pas rejoindre ou dévier les lignes formées par le témoin positif. Un sérum est faiblement positif s'il incurve la ligne du témoin positif vers le puits de la solution antigénique sans former de ligne de précipitation décelable avec la solution antigénique. On ne peut conclure sur le résultat si la réaction ne peut pas être clairement identifiée comme positive ou négative. L'épreuve n'est pas valable si les témoins ne donnent pas les résultats espérés. Les sérums donnant des résultats non interprétables ou faiblement positifs peuvent être concentrés et testés de nouveau.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'existe pas de vaccin commercialisé contre la leucose enzootique bovine. L'exposé suivant résume les travaux réalisés pour essayer de produire un vaccin efficace.

Chez les veaux nés de mères infectées par le BLV, les anticorps maternels dirigés contre gp51 pourraient être importants pour la protection contre l'infection naturelle. Cependant, des expériences utilisant du BLV inactivé, des cellules FLK infectées et fixées ou de la gp51 ont suggéré que les Ac anti-gp51 ne fournissent qu'une protection de courte durée. Il a aussi été montré que la vaccination de bovins avec des cellules vivantes provenant de la lignée cellulaire BL3, obtenue à partir d'un animal atteint de leucose bovine sporadique, induisait une protection de courte durée. La nature de l'antigène impliqué dans la protection était probablement un antigène tumoral associé à l'infection virale (19). Des cellules ovines, synthétisant uniquement les produits de traduction du gène *env*, à savoir gp51 et gp30, et la protéine majeure de structure p24, induisent une réponse sérologique chez le bovin (1) ; les bovins sont protégés après des vaccinations répétées avec ces cellules.

La vaccination chez le mouton à l'aide d'un virus recombinant avec le virus de la vaccine exprimant la gp51 du BLV est protectrice (16). Cependant, cette protection n'est pas associée à la présence de taux détectables d'anticorps neutralisants. La réponse immunitaire cellulaire jouerait donc un rôle majeur dans l'immunité protectrice contre l'infection à BLV. La production de gp51 est possible via un virus recombinant avec le virus de la vaccine ou en système d'expression levures, contenant le gène *env*. Ces systèmes d'expression ont permis de protéger des moutons après inoculation d'épreuve (8). Malgré ces avancées dans nos connaissances, il n'existe actuellement pas de vaccins commercialisés pour le contrôle de la LBE.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALTANER C., BARR J., ALTANEROVA V. & JANIK V. (1991). Protective vaccination against bovine leukaemia virus infection by means of cell-derived vaccine. *Vaccine*, **9**, 889–895.
2. BALLAGI-PORDANY A. & BELAK S. (1996). The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol. Cell. Probes*, **10**, 159–164.
3. BEIER D., BLANKENSTEIN P. & FECHNER H. (1998). Chances and limitations for the use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in cattle. *Dtsch Tierarztl. Wochenschr.*, **105**, 408–412.
4. BEIER D., RIEBE R., BLANKENSTEIN P., STARICK E., BONDZIO A. & MARQUARDT O. (2004). Establishment of a new bovine leucosis virus producing cell line. *J. Virol. Methods*, **121**, 239–246.
5. BEYER J., KÖLLNER B., TEIFKE J.P., STARICK E., BEIER D., REIMANN I., GRUNWALD U. & ZILLER M. (2002). Cattle infected with bovine leukaemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B-cell lymphopenia. *J. Vet. Med. [B]*, **49**, 270–277.
6. BELAK S. & BALLAGI-PORDANY A. (1993). Experiences on the application of the polymerase chain reaction in a diagnostic laboratory. *Mol. Cell. Probes*, **7**, 241–248.

7. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (1991). Council Directive of Amending Directive 64/432/EEC as Regards the Diagnosis of Bovine Brucellosis and Enzootic Bovine Leukosis. *Off. J. European Communities Council*, 14 May 1991.
8. DANIEL R.C.W., GATEI M.H., GOOD M.F., BOYLE D.B. & LAVIN M.F. (1993). Recombinant viral vaccines for enzootic bovine leucosis. *Immunol. Cell Biol.*, **71**, 399–404.
9. DIMMOCK C.K., RODWELL B.J. & CHUNG Y.S. (1987). Enzootic bovine leucosis. Pathology, Virology and Serology. Australian standard diagnostic techniques for animal disease. No. 49. Australian Agricultural Council.
10. EMANUELSSON U., SCHERLING K. & PETTERSSON H. (1992). Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, **12**, 121–131.
11. FECHNER H., BLANKENSTEIN P., LOOMAN A.C., ELWERT J., GEUE L., ALBRECHT C., KURG A., BEIER D., MARQUARDT O. & EBNER D. (1997). Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology*, **237**, 261–269.
12. GILLET N., FLORINS A., BOXUS M., BURTEAU C., NIGRO A., VANDERMEERS F., BALON H., BOUZAR A.-B., DEFOICHE J., BURNY A., REICHERT M., KETTMANN R. & WILLEMS L. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, **4**, 18.
13. JOHNSON R. & KANEENE J.B. (1992). Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet. Bull.*, **62**, 287–312.
14. MILLER L.D., MILLER J.M., VAN DER MAATEN M.J. & SCHMERR M.J.F. (1985). Blood from bovine leukaemia virus-infected cattle: antigen production correlated with infectivity. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 808–810.
15. MONTI G.E., SCHRIJVER R. & BEIER D. (2005). GENETIC DIVERSITY AND SPREAD OF BOVINE LEUKAEMIA VIRUS ISOLATES IN ARGENTINE DAIRY CATTLE. *ARCH. VIROL.*, **150**, 443–458.
16. OHISHI K., SUZUKI H., YAMAMOTO T., MARUYAMA T., MIKI K., IKAWA Y., NUMAKUNAI S., OKADA K., OHSHIMA K. & SUGIMOTO M. (1991). Protective immunity against bovine leukaemia virus (BLV) induced in carrier sheep by inoculating with a vaccinia virus – BLV env recombinant: Association with cell mediated immunity. *J. Gen. Virol.*, **72**, 1887–1892.
17. ROLA M. & KUZMAK J. (2002). The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J. Virol. Methods*, **99**, 33–40.
18. TEIFKE J.P. & VAHLENKAMP T.W. (2007). Detection of bovine leukemia virus (BLV) in tissue samples of experimentally infected cattle. (submitted).
19. THEILEN G.H., MILLER J.M., HIGGINS J., RUPPANER R.N. & GARRETT W. (1982). Vaccination against bovine leukaemia virus infection. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.*, **15**, 547–559.
20. VAN DER MAATEN M.J. & MILLER J.M. (1976). Replication of bovine leukaemia virus in monolayer cell cultures. *Bibl. Haematol.*, **43**, 360–362.
21. VENABLES C., MARTIN T.C. & HUGHES S. (1997). Detection of bovine leukosis virus proviral DNA in whole blood and tissue by nested polymerase chain reaction. Fourth International Congress of Veterinary Virology, Edinburgh, UK, Abstracts, 202.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la leucose bovine enzootique (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).

SEPTICÉMIE HÉMORRAGIQUE

RÉSUMÉ

*La septicémie hémorragique (SH) est une maladie importante des bovins et des buffles caractérisée par l'évolution d'une septicémie aiguë souvent mortelle associée à une morbidité et une mortalité élevées. Elle est provoquée par certains sérotypes de *Pasteurella multocida*.*

*Le diagnostic de la SH est fondé sur l'isolement de l'agent causal, *P. multocida*, à partir du sang ou de la moelle osseuse d'un animal mort, par des méthodes culturales et biologiques, et son identification par des méthodes biochimiques, sérologiques et moléculaires.*

Identification de l'agent pathogène : *des cultures pures de *P. multocida* peuvent être obtenues en ensemençant les échantillons par la méthode des stries sur des milieux gélosés. La bactérie est ensuite identifiée sur la base de ses caractères morphologiques, culturaux et biochimiques.*

Conventionnellement, l'identification du sérotype spécifique est effectuée en utilisant une ou plusieurs méthodes sérologiques. Ces méthodes incluent l'agglutination rapide sur lame, l'hémagglutination indirecte en utilisant des hématies de moutons sensibilisées avec des extraits bactériens pour le typage des antigènes capsulaires, des épreuves d'immunodiffusion en gélose en utilisant des extraits cellulaires traités par la chaleur pour le typage des antigènes somatiques, ou l'agglutination en utilisant des bactéries traitées par l'acide. La confirmation de l'identification peut être obtenue par des techniques moléculaires.

Épreuves sérologiques : *les épreuves sérologiques de détection des anticorps spécifiques ne sont pas normalement employées au titre du diagnostic.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *les vaccins efficaces contre la septicémie hémorragique sont des vaccins à bactéries inactivées par le formol, associés ou non à un adjuvant. La présence d'un adjuvant permet d'augmenter le niveau et de prolonger la durée de l'immunité.*

Les cultures de semence destinées à la production des vaccins devraient contenir des bactéries capsulées. Les vaccins sont normalisés en tenant compte de la densité bactérienne déterminée à partir de tests de turbidité et du poids bactérien sec. Les tests d'activité sont effectués sur souris et/ou sur lapins.

A. INTRODUCTION

La septicémie hémorragique (SH) est une maladie importante des bovins et des buffles survenant sous la forme d'épizooties catastrophiques dans maints pays d'Asie et d'Afrique, et provoquant une mortalité et une morbidité élevées (3, 5, 15, 21, 22, 31, 44). La maladie a été également décrite chez des mammifères sauvages dans plusieurs pays d'Asie et d'Europe (10, 41). Dans la plupart des pays asiatiques, la maladie se manifeste généralement du fait des conditions climatiques typiques de la mousson (forte humidité et températures élevées). La maladie est causée par *Pasteurella multocida*, un coccobacille Gram-négatif le plus souvent hébergé en tant que commensal dans le tractus respiratoire supérieur des animaux. Le sérotype asiatique B:2 et le sérotype africain E:2 (système de Carter-Heddleston), correspondant aux sérotypes 6:B et 6:E (système de Namioka-Carter), sont principalement responsables de la maladie (26). Le sérotype B:2,5 prédomine chez les animaux sauvages. D'autres sérotypes, à savoir A:1 et A:3, ont également été associés au développement de cas ressemblant à la SH chez des bovins et des buffles aux Indes (29).

Le terme de SH a été souvent utilisé à tort pour désigner la fièvre des transports ou d'autres infections. Il en est résulté des rapports erronés signalant l'existence de la maladie en Amérique du sud et dans d'autres contrées. La même confusion existait déjà dans les années 1940 et les différences entre les maladies avaient été clarifiées

(1, 12). En effet la SH et la fièvre des transports sont bien deux entités distinctes provoquées par des bactéries différentes (*Pasteurella multocida* et *Mannheimia haemolytica*). À la différence de la SH, la fièvre des transports n'est pas une septicémie et elle ne cause pas des hémorragies pétéchiales multisystémiques.

Les manifestations cliniques de la maladie typique provoquée par des souches des sérotypes B:2 ou E:2 incluent une élévation de la température, une détresse respiratoire avec jetage nasal, de l'écume aux lèvres et une évolution rapide vers la mort. L'infection par les sérotypes A:1 et A:3 génère principalement une pneumonie entraînant la mort. La septicémie est la caractéristique commune à toutes les formes de la maladie. La période d'incubation varie de 3 à 5 jours. Dans les formes suraiguës, la mort soudaine sans signe clinique caractéristique peut être constatée (15, 22). Les buffles sont généralement plus sensibles que les bovins et montrent les formes les plus graves de la maladie avec des symptômes prononcés. L'œdème sous-cutané qui s'étend souvent de la mâchoire inférieure à la poitrine est une caractéristique distinctive de la maladie dans les zones d'enzootie. La plupart des cas mortels concernent les veaux âgés et les jeunes adultes.

Des épizooties importantes peuvent survenir dans les zones d'enzootie aussi bien que dans les zones non enzootiques (15, 22). Dans un passé récent, la SH était considérée comme une complication secondaire des épisodes de fièvre aphteuse chez les bovins et les buffles. Le taux de létalité approche 100 % si le traitement n'est pas mis en œuvre dès le début de la maladie (15, 22).

Le diagnostic de la maladie s'appuie sur les signes cliniques, les lésions macroscopiques et les caractéristiques de morbidité et de mortalité, la confirmation étant obtenue par l'isolement des agents pathogènes et leur caractérisation par des méthodes conventionnelles et moléculaires.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Lésions *post mortem*

La plupart des animaux succombant à la SH montrent typiquement un gonflement du cou dû à un important œdème teinté de sang. D'abondantes pétéchies sont visibles sur de nombreux tissus, en particulier sur les membranes séreuses. Les cavités thoracique, péricardique et abdominale peuvent contenir un exsudat séro sanguinolent. Les poumons sont congestionnés et œdémateux. Microscopiquement, on constate une pneumonie interstitielle et des foyers d'infiltration par des polynucléaires neutrophiles et des macrophages dans de nombreux tissus. Ces lésions sont semblables à celles habituellement observées dans les états septiques graves.

2. Identification de l'agent pathogène

• Méthodes culturelles et biochimiques

La septicémie dans la SH se produit à l'étape terminale de la maladie. Par conséquent, les échantillons de sang prélevés sur les animaux malades avant la mort peuvent ne pas toujours contenir la bactérie. *P. multocida* n'est pas non plus systématiquement présente dans les sécrétions nasales des animaux malades.

Un échantillon de sang prélevé directement ou sur écouvillon dans la cavité cardiaque est satisfaisant s'il est pris dans les quelques heures suivant la mort. Un os long débarrassé des tissus périphériques peut être prélevé si l'animal est mort depuis plus longtemps. Si une autopsie ne peut être réalisée, du sang peut être prélevé dans la veine jugulaire par aspiration ou après incision. Les échantillons de sang placés dans un milieu de transport adéquate doivent être conditionnés de façon à éviter toute fuite et expédiés sous froid (glace).

Des colorations de Gram, de Leishman ou au bleu de méthylène peuvent être réalisées sur les frottis de sang provenant des animaux atteints. Les microorganismes se présentent sous la forme de courts bacilles Gram-négatifs à coloration bipolaire. Mais aucune conclusion diagnostique ne peut être portée sur la seule base de l'examen microscopique direct.

Les échantillons de sang, ou les écouvillons élués dans 2 à 3 ml d'eau salé physiologique stérile, sont mis en culture. Lorsqu'il s'agit d'un os long, sa surface est nettoyée à l'alcool avant de le sectionner. La moelle, extraite aseptiquement, est mise en culture. La mise en culture directe donne des résultats habituellement satisfaisants à condition que le matériel prélevé soit frais et libre de contaminants ou de germes d'invasion *post mortem* susceptibles d'entraver ou de masquer la croissance des *Pasteurella* présentes.

Pour les examens biologiques, un petit volume (0,2 ml) de prélèvement sanguin ou un fragment de moelle osseuse dissocié dans de l'eau salée physiologique est inoculé à des souris par voie sous-cutanée ou intramusculaire. La souris sert habituellement de filtre biologique pour les autres microorganismes. Si des *P. multocida* viables sont présentes, les souris meurent au bout de 24 à 36 h après l'inoculation et les bactéries

peuvent être observées à l'état pur dans les frottis sanguins après coloration. Des cultures pures sont habituellement obtenues à partir du sang des souris, même lorsque les prélèvements sont issus de carcasses assez anciennes. Le microorganisme isolé peut être alors être identifié sur la base de ses caractères morphologiques, culturels, biochimiques et sérologiques.

Un milieu approprié pour la croissance de *Pasteurella* est la gélose caséine/saccharose/levures (CSY pour Casein/Sucrose/Yeast) additionnée de 5 % de sang. Ce milieu contient de l'hydrolysate de caséine (3 g), du saccharose (3 g), de l'extrait de levures (5 g), du chlorure de sodium (5 g), de l'hydrogèneorthophosphate de dipotassium anhydre (3 g), et de l'eau distillée (1 litre). Le pH est ajusté entre 7,3 et 7,4 avant d'ajouter 1,5 % d'agar. Le milieu est autoclavé à 1 bar pendant 15 min. Après refroidissement aux alentours de 50 à 60 °C, 5 % de sang de veau (sans anticorps dirigés contre *P. multocida*) sont ajoutés (51).

Les *P. multocida* fraîchement isolées forment après 24 h d'incubation à 37 °C sur gélose au sang des colonies lisses, grisâtres, brillantes et translucides, de 1 mm de diamètre. Les colonies obtenues sur gélose CSY sont plus grandes. Les vieilles cultures, surtout lorsque les bactéries sont cultivées sur des milieux exempts de sang, peuvent produire des colonies plus petites. *P. multocida* ne se multiplie pas sur gélose de MacConkey. Des frottis de sang ou de tissu colorés par la méthode de Gram montrent des bactéries Gram-négatives de forme coccoïde courte, ovoïde et à coloration bipolaire. Un certain polymorphisme peut être noté, notamment dans les vieilles cultures où on observe des formes nettement bacillaires de longueur variable. L'aspect bipolaire peut être plus visible en utilisant la coloration au bleu de méthylène ou la coloration de Leishman.

P. multocida est une bactérie produisant une oxydase, une catalase et de l'indole. Elle ne produit pas d'H₂S ni d'uréase, n'utilise pas le citrate, ni ne liquéfie la gélatine. Glucose et saccharose sont toujours fermentés avec production d'acide, mais sans production de gaz. La plupart des souches fermentent également le sorbitol. Quelques souches fermentent l'arabinose, le xylose et le maltose, mais aucune ne fermente la salicine et le lactose.

Une propriété commune aux souches de *P. multocida* causant la SH est leur aptitude à produire l'enzyme hyaluronidase (13). Après avoir identifié le genre et l'espèce par les caractères culturels et les tests biochimiques, il est possible d'utiliser la production de hyaluronidase comme test de caractérisation spécifique des *Pasteurellae* causant la SH. Il faut noter que les souches de sérotype B autres que B:2 (ou 6:B) et de sérotype E sont hyaluronidase-négatives.

Une bactérie produisant de l'acide hyaluronique est ensemencée en strie au centre d'une boîte de gélose au dextrose et à l'amidon. La culture de *Pasteurella* à tester pour la production de hyaluronidase est ensemencée selon une strie perpendiculaire à la précédente. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 18 h. À l'origine, ce test était réalisé avec une souche de *Streptococcus equi* productrice d'acide hyaluronique, mais il est cependant plus commode d'utiliser une culture de *P. multocida* type A capsulée donnant des colonies mucoïdes. Au point d'intersection des deux stries, la ligne de croissance mucoïde de la bactérie produisant l'acide hyaluronique est réduite à une mince ligne de culture, révélant la production de hyaluronidase par la culture test. L'utilisation de géloses fraîchement préparées et d'un incubateur humidifié faciliteront la production d'acide hyaluronique et, de ce fait, l'interprétation du test.

• Méthodes de sérotypage

Plusieurs épreuves sont utilisées pour l'identification des sérotypes de *P. multocida* causant la SH : une épreuve rapide d'agglutination sur lame (35), une épreuve d'hémagglutination indirecte (IHA) pour le typage capsulaire (11), une épreuve d'agglutination utilisant des bactéries traitées à l'acide chlorhydrique pour le typage somatique (36), l'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) (4, 25, 52), et l'épreuve de contre-immunoélectrophorèse (CIEP) (14).

Les anti-sérums hyperimmuns utilisés dans la plupart de ces épreuves sont préparés sur des lapins immunisés contre les souches spécifiques de référence. Des cultures de 6 à 8 h en bouillon CSY sont ensemencées sur gélose CSY au sang. Après une nuit (18 à 20 h) d'incubation, les bactéries sont lavées dans de l'eau salée physiologique contenant 0,3 % de formol. La turbidité de la suspension bactérienne est ajustée sur celle du tube N°4 de l'échelle de Mac-Farland. Les lapins sont inoculés par voie intraveineuse à 3-4 jours d'intervalle avec 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et, finalement, 2 ml de cette suspension. Les lapins sont inoculés par voie sous-cutanée ou intramusculaire 1 semaine après la dernière injection avec 0,5 ml d'une suspension similaire, mais vivante. Les animaux sont saignés 10 jours plus tard. Le sérum est conservé à -20 °C, mais des aliquotes pour usage régulier sont conservés à 4 °C après adjonction de merthiolate au 1/10 000.

a) Épreuve rapide d'agglutination sur lame (typage capsulaire)

Une colonie isolée est mélangée avec une goutte d'eau salée physiologique sur une lame, une goutte d'antisérum est ajoutée, et la lame est chauffée doucement. Des gros agglutinats flocculaires apparaissent

dans les 30 s. Les vieilles cultures peuvent donner des fins agglutinats granulaires qui sont plus longs à apparaître.

b) Épreuve d'héماغglutination indirecte (typage capsulaire)

Cette épreuve était réalisée à l'origine avec des hématies humaines du groupe O sensibilisées avec l'antigène (11), remplacées depuis par des hématies de mouton (42, 51). L'antigène est préparé comme suit :

Une culture de 6 à 8 h en bouillon de la souche de référence est ensemencée sur des boîtes de gélose CSY au sang et incubées durant la nuit à 37 °C. La culture obtenue est reprise dans 3 ml d'eau salée physiologique contenant 0,3 % de formol. La suspension obtenue est ensuite chauffée à 56 °C durant 30 min, centrifugée à 3 000 *g* pendant 15 min à 4 °C, et le liquide clair surnageant est placé à –20 °C. Lorsqu'une centrifugeuse réfrigérée n'est pas disponible, il convient de réaliser la centrifugation à 1 500 *g* pendant 30 min. Le liquide surnageant est utilisé comme extrait antigénique. La même procédure est suivie pour préparer un extrait antigénique à partir de la souche inconnue à typer.

Le sang de mouton est prélevé aseptiquement sur anticoagulant et centrifugé à 500 *g* pendant 10 min. Les hématies sont lavées 3 fois dans de l'eau salée physiologique stérile. L'extrait antigénique préparé à partir de la souche inconnue selon la méthode précédemment décrite est utilisé pour sensibiliser les hématies, ou adsorbé sur les hématies. Cela est obtenu en additionnant 15 volumes de l'extrait antigénique aux hématies et en incubant le mélange pendant 1 h à 37 °C en ayant soin de l'agiter régulièrement. Les hématies sensibilisées sont récupérées par centrifugation, lavées 3 fois en eau salée physiologique stérile et diluées de façon à obtenir une suspension finale à 1 % en eau salée physiologique. L'antisérum hyperimmun spécifique de type (3 volumes) est adsorbé par addition d'hématies (1 volume) pendant 30 min à température ambiante. Une centrifugation à 500 *g* pendant 10 min permet de séparer les hématies et l'antisérum adsorbé est ensuite inactivé par chauffage à 56 °C pendant 30 min.

L'épreuve elle-même peut être effectuée en tubes ou en plaques. Elle est réalisée sur deux rangées. L'épreuve décrite ci-dessous correspond à l'utilisation de plaques de microtitrage standard.

- i) L'extrait capsulaire de la souche inconnue, préparé selon la méthode précédemment décrite, est utilisé pour sensibiliser les hématies de mouton. Les sérums hyperimmuns spécifiques de type préparés sur lapin contre les types A, B, D et E sont dilués comme suit :
- ii) Quatre rangées séparées de cupules sont utilisées ; la première cupule de chaque rangée est remplie avec 0,72 ml d'eau salée physiologique ; les 6 cupules (ou plus) suivantes reçoivent 0,4 ml.
- iii) Les sérums hyperimmuns spécifiques de type sont dilués chacun séparément dans chaque rangée. On ajoute 0,08 ml de sérum dans la première cupule, en mélangeant avec une pipette. Un volume de 0,4 ml est transféré depuis la première cupule dans la cupule suivante, mélangé, et le processus répété de cupule en cupule jusqu'à la septième. La dilution 1/10 est obtenue dans la première cupule et une dilution de raison 2 est ensuite obtenue dans les cupules suivantes.
- iv) Les hématies sensibilisées avec l'antigène sont réparties sous un volume de 0,4 ml dans l'ensemble des cupules de la plaque. La plaque est légèrement secouée et laissée à la température ambiante. Du fait de l'adjonction des hématies sensibilisées, les dilutions de sérum sont doublées, ce qui donne ainsi une dilution 1/20 dans la première cupule, 1/40 dans la deuxième, etc. Des témoins positif / négatif et eau salée physiologique sont inclus à chaque essai.
- v) Une première lecture est faite au bout de 2 h et la lecture finale après 18 h. La lecture est considérée positive en présence d'un dépôt d'hématies agglutinées le long des parois des cupules concaves ; elle est négative lorsqu'un bouton se forme au centre des cupules. Un score arbitraire de 1 à 4 est donné en fonction de l'intensité de l'agglutination. Une souche inconnue est identifiée par le sérum hyperimmun qui l'agglutine. La souche est considérée non typable lorsqu'elle n'est agglutinée par aucun sérum.

Bien que l'IHA puisse être utilisée pour le typage des souches inconnues, l'épreuve elle-même est plus efficace lorsqu'il s'agit des sérotypes B et E, et il est plus fiable comme épreuve quantitative vis-à-vis de ces souches.

c) Épreuve d'immunodiffusion en gélose

Des épreuves d'immunodiffusion en gélose (IDG) sont utilisées comme outils de typage « capsulaire » ou « somatique » selon les caractéristiques des antigènes et des antisérums employés. La technique d'immunodiffusion double est utilisée. Des puits creusés dans le gel sont disposés selon un schéma circulaire comportant un puits central et 6 puits périphériques.

- i) *Typage capsulaire* : le milieu gélifié est de la gélose Noble à 1 % (ou produit équivalent) dans du tampon phosphate 0,2 M contenant du merthiolate à la concentration de 1/10 000 (4, 52). Les antigènes et les antisérums sont les mêmes que ceux utilisés pour le typage capsulaire par la méthode d'hémagglutination indirecte (11). L'antisérum de référence est placé dans le puits central, et les antigènes à tester sont placés dans les puits périphériques en alternance avec les antigènes homologues de référence.
- ii) *Typage somatique* : le milieu gélifié est de la gélose Noble spéciale (ou un produit équivalent) à la concentration de 0,9 % dans une solution de chlorure de sodium à 0,85 %.
- iii) Pour la préparation de l'antigène, la culture obtenue à partir de chaque boîte est reprise dans 1 ml d'une solution de chlorure de sodium à 8,5 % contenant 0,3 % de formol. La suspension est chauffée à 100 °C durant 1 h, puis centrifugée. Le liquide surnageant est utilisé comme antigène.
- iv) Les antisérums contre les 16 types somatiques (25) sont préparés sur poulets. Une suspension bactérienne inactivée émulsifiée dans l'huile¹ (1 ml) est injectée à des poulets mâles âgés de 12 à 16 semaines, par voie sous-cutanée dans la partie moyenne du cou. Une nouvelle injection de 1 ml est faite 3 semaines plus tard par voie intramusculaire dans les pectoraux, à raison de 0,5 ml de chaque côté du sternum. Les oiseaux sont saignés 1 semaine après. Le sérum est séparé et préservé en ajoutant 0,01 % de thiomersal et 0,06 % de phénol. Les sérums sont testés vis-à-vis de tous les types somatiques, et ceux qui donnent une réaction croisée sont écartés. Quelques préparations d'antisérums dirigées contre B:2 peuvent donner une réaction croisée avec le type somatique 5.
- v) L'antigène à tester est placé dans le puits central et les antisérums dirigés contre les différents sérotypes sont distribués dans les puits périphériques. Tous les sérotypes (asiatiques et africains) responsables de la SH réagiront avec le sérum anti-2. Des réactions croisées peuvent apparaître avec le type 5.

d) Contre-immunoélectrophorèse

La contre-immunoélectrophorèse (CIEP) constitue une méthode rapide pour l'identification des cultures des types capsulaires B et E.

- i) *Préparation de l'antigène capsulaire* : l'antigène capsulaire est préparé de manière identique à celle décrite pour l'épreuve d'hémagglutination indirecte.
- ii) *Préparation des antisérums hyperimmuns* : les antisérums sont préparés sur lapins comme pour l'épreuve d'hémagglutination indirecte.
- iii) *Milieu pour la CIEP* : le milieu pour la CIEP se compose d'agarose (2,0 g), de barbital sodique (2,06 g), d'acide di-éthyle barbiturique (0,37 g), d'eau distillée (180 ml), et de merthiolate à 1/1 000 (20 ml).
- iv) *Tampon Véronal acétate (tampon barbital)* : le tampon barbital se compose de barbital sodique (29,24 g), d'acétate de sodium anhydre (11,70 g), d'acide chlorhydrique 0,1 N (180 ml), et d'eau distillée ajustée à 3 litres. Le pH devrait être égal à 8,8.
- v) *Préparation des plaques* : les plaques d'électrophorèse sont préparées en pré-coulant 12 ml de milieu sur des plaques de verre (57 mm × 70 mm). 7 puits de 4 mm de diamètre et séparés de 7 mm sont creusés sur une rangée. Des puits identiques disposés parallèlement aux précédents sont creusés à 6 mm (de centre à centre) des précédents.
- vi) *Réalisation des épreuves* : le puits du côté de la cathode est rempli avec un volume de 20 µl d'antigène capsulaire, tandis que qu'un même volume d'antisérum spécifique de type est placé dans le puits du côté de l'anode. Les témoins inclus dans l'épreuve sont une solution à 0,85 % de chlorure de sodium opposée à l'antisérum positif, un extrait capsulaire opposé à du sérum de lapin négatif, ainsi que des échantillons témoins négatif et positif. La cuve d'électrophorèse est remplie avec du tampon barbital, pH 8,8. L'antigène et l'antisérum sont soumis à l'électrophorèse durant 30 min à 150 V (25 V/cm). Les plaques sont ensuite examinées pour rechercher les lignes de précipitation.
- vii) *Interprétation des résultats* : la présence d'une ligne nette entre les puits contenant l'antigène et l'antisérum est considérée comme un résultat positif.

1 Les antigènes bactériens dans le bouillon sont recouverts avec une huile minérale légère (adjuvant) et ensuite émulsifiés (stabilisés) avec un agent émulsifiant, dans ce cas, de la lanoline (graisse de laine). L'adjonction de l'agent émulsifiant s'impose dans la mesure où la phase aqueuse contenant les bactéries (bouillon) ne peut se mélanger à la phase huileuse (adjuvant). La proportion d'huile par rapport à l'agent émulsionnant variera avec les différents lots de lanoline et devra être ajustée en conséquence. Plus le pourcentage de la lanoline est élevé, plus grande sera la stabilité de l'émulsion. Cependant, un pourcentage élevé de lanoline rendra l'émulsion très visqueuse, gênant beaucoup la réalisation de la vaccination et induisant des réactions locales chez les animaux vaccinés.

e) Épreuves d'agglutination (antigènes somatiques)

L'antigène somatique « O » est préparé par une méthode identique à celle précédemment décrite pour l'épreuve d'hémagglutination indirecte (34, 36). Une culture test de 6 à 8 h est ensemencée sur une gélose CSY au sang et incubée une nuit. La culture obtenue est reprise, pour chaque boîte, dans 2 à 3 ml de solution salée physiologique contenant 0,3 ml de formol, et centrifugée à 3 000 *g* pendant 15 min à 4 °C (ou 1 200 à 1 500 *g* pendant 30 à 45 min à la température ambiante). Les culots bactériens sont resuspendus dans 25 ml d'une solution normale d'HCl en eau salée à 0,85 % de façon à obtenir une opacité approximativement équivalente à celle du tube No 6 de l'échelle de Brown, et incubés durant la nuit. La suspension est ensuite centrifugée, le liquide surnageant éliminé, et le culot bactérien lavé 3 fois successivement dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) à pH 5, 6 puis 7.

Pour terminer, une suspension cellulaire d'opacité équivalente à celle du tube No 6 de Brown est préparée dans du PBS à pH 7. Toutes les suspensions auto-agglutinables devront être éliminées.

Les antisérums sont préparés vis-à-vis de suspensions de cellules bactériennes entières des souches de référence B:2 (SH asiatique), E:2 (SH africaine) et 11:B (australienne 989, non SH). Les réactions d'agglutination sont effectuées sur lame et l'antigène à tester est testé vis-à-vis des 3 types de sérums. Une fine agglutination granulaire indique une agglutination somatique spécifique. La réalisation des épreuves en utilisant comme témoins des antigènes de référence favorisera la lecture et l'interprétation. Lorsqu'une agglutination partielle non spécifique survient, le fait de refaire l'épreuve en diluant préalablement les sérums au dixième peut aider à identifier les antigènes somatiques.

f) Désignation des Sérotypes

Globalement, deux systèmes de typage sont adoptés. L'un correspond au typage des antigènes capsulaires par l'épreuve d'IHA de Carter (11) ou par des épreuves d'immunodiffusion en gélose (4, 52). L'autre correspond au typage des antigènes somatiques par la méthode de Namioka & Murata (34, 36, 37), et par celle de Heddlestone *et al.* (25). Il est classiquement convenu que la désignation des sérotypes devrait être fondée sur la double référence aux antigènes somatiques et capsulaires. Les deux systèmes généralement en usage sont ceux de Namioka-Carter et ceux de Carter-Heddlestone. Dans l'ancien système, les sérotypes asiatiques et africains de SH sont respectivement désignés 6:B et 6:E, alors que dans le dernier système, ils sont désignés B.2 et E.2.

g) Détermination de la sensibilité aux agents antimicrobiens

La détermination de la sensibilité aux agents antimicrobiens est rendue nécessaire par la proportion souvent élevée, comme l'ont montré Kehrenberg *et al.* (27) dans une revue consacrée à ce sujet, des souches de *P. multocida* résistantes aux antimicrobiens communément utilisés. Les méthodes de détermination de la sensibilité aux agents antimicrobiens sont décrites dans le chapitre 1.1.6., « Méthodes de laboratoire utilisées pour les essais d'antibiorésistance ». La méthode de diffusion en gélose (méthode des disques) utilisée pour tester la sensibilité des bactéries habituelles à croissance rapide est bien adaptée à *P. multocida* (6). Des résultats fiables peuvent être obtenus avec les épreuves de diffusion en gélose qui utilisent une méthodologie normalisée offrant une bonne corrélation entre le diamètre d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice (CMI) et permettant de catégoriser les souches en cliniquement sensibles et résistantes. Le choix des agents antimicrobiens les plus appropriés à tester est une décision qui relève de chaque laboratoire en tenant compte des besoins des praticiens vétérinaires et des produits disponibles pour l'usage vétérinaire dans le pays considéré. Les agents antimicrobiens ayant prouvé leur efficacité clinique sont la pénicilline, l'amoxicilline (ou l'ampicilline), la céfalotine, le ceftiofur, la cefquinome, la streptomycine, la gentamicine, la spectinomycine, le florénicol, la tétracycline, les sulfonamides, l'association triméthoprim/sulfaméthoxazole, l'érythromycine, la tilmicosine, l'enrofloxacin (ou d'autres fluoroquinolones) et la norfloxacin.

- **Méthodes d'identification de l'acide nucléique**

a) Analyse par amplification en chaîne par polymérase spécifique de *Pasteurella multocida*

Il est possible de mettre à profit la rapidité, la sensibilité et la spécificité de la technologie d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) pour la détection de *P. multocida* (28, 30, 38, 39, 49). La rapidité et la spécificité élevée de deux des épreuves spécifiques de *P. multocida* (30, 49) leur confère une efficacité optimale sans besoin d'hybridation additionnelle. Bien que l'utilisation de l'hybridation puisse confirmer la spécificité, cette approche n'est habituellement possible que dans des laboratoires spécialisés. Les PCR spécifiques de *P. multocida* (30, 49) identifient toutes les sous-espèces de *P. multocida*. La PCR développée par Mifflin et Blackall (30) avait été décrite comme donnant des réactions faussement positives avec *P. avium* biovar 2 et *P. canis* biovar 2, tandis que celle développée par Townsend *et al.* (49) donnait des réactions faussement positives avec *P. canis* biovar 2 (la méthode n'avait pas été testée vis-à-vis de *P. avium* biovar 2). En fait, *P. avium* biovar 2 et *P. canis* biovar 2 ont été récemment renommées

P. multocida (18), et la méthode de Miflin et Blackall (30) comme celle de Townsend *et al.* (49) sont maintenant considérées toutes deux comme spécifiques de *P. multocida*. Quelques difficultés demeurent néanmoins puisque l'on sait maintenant que les organismes saccharose-négatifs ressemblant à *P. multocida* isolées à partir des plaies de morsure de chat forment deux groupes, les deux étant indistinctement révélés par l'épreuve PCR spécifique de *P. multocida* développée par Miflin et Blackall (30) alors qu'un seul a été confirmé appartenir véritablement à *P. multocida* par d'autres méthodes génétiques (19). L'épreuve PCR développée par Townsend *et al.* (49) est décrite dans le paragraphe suivant.

Une fraction de colonie isolée de la bactérie suspecte est transférée directement dans le mélange réactionnel pour PCR. Il est aussi possible d'extraire l'ADN matriciel à partir de 2 µl d'une culture en bouillon, qu'elle soit mélangée ou pure. Toutes les méthodes actuellement utilisées pour la préparation de l'ADN matriciel produisent des résultats reproductibles avec les amorces KMT1 (49), et permettent de détecter ≤ 10 bactéries par réaction. La sensibilité et la spécificité de la PCR spécifique de *P. multocida* offrent l'argument le plus convaincant en faveur de l'usage de cette technologie dans les investigations de laboratoire concernant des cas suspectés de SH. *Pasteurella multocida* peut être détectée quel que soit la pureté du spécimen, ce qui constitue un avantage lorsque le prélèvement a été réalisé trop longtemps après la mort ou lorsqu'on travaille sur un écouvillon amygdalien ou nasal. Dans ce dernier cas, l'écouvillon devrait être inoculé dans 2 ml de bouillon CSY et incubé pendant 2 à 4 h sur un rouleur ; 2 µl de culture sont ensuite ajoutés directement au mélange réactionnel pour PCR avant l'amplification.

Séquences des amorces (49) :

PCR spécifique de <i>P. multocida</i> :	KMT1T7	5'-ATC-CGC-TAT-TTA-CCC-AGT-GG-3'
	KMT1SP6	5'-GCT-GTA-AAC-GAA-CTC-GCC-AC-3'

Conditions de réalisation de la PCR :

L'ADN matriciel est ajouté au mélange réactionnel pour PCR (volume total de 25 µl) contenant le tampon PCR (1×), 200 µM de chaque désoxynucléotide-triphosphate (dNTP), 2 mM de MgCl₂, 3,2 pmol de chaque amorce et 0,5 u de *Taq* ADN polymérase. Les paramètres de cycle pour un thermocycleur Corbett FTS-320 (ou similaire) sont les suivants : une première dénaturation de 5 min à 95 °C ; 30 cycles d'1 minute à 95 °C, d'1 min à 55 °C, d'1 min à 72 °C ; suivis d'une dernière élongation (72 °C) de 7 min. La réaction est maintenue à 4 °C jusqu'à la réalisation de l'électrophorèse ; 5 µl de chaque échantillon sont soumis à l'électrophorèse dans un gel d'agarose à 2 % dans du tampon tris-acétate (TAE) (1×) classique à 4 V/cm pendant 1 h. Le gel est coloré avec du bromure d'éthidium à 1 % et les fragments d'ADN sont révélés par trans-illumination avec des UV. Ces amorces ont été de plus en plus utilisées pour l'identification rapide des isolats de SH (23, 43). La technique de PCR décrite par Miflin et Blackall (30) est fondée sur la séquence génique de l'ARN ribosomique 23s de *P. multocida* et peut être adoptée pour l'identification de ces bactéries.

b) Système de typage capsulaire de *Pasteurella multocida* par PCR multiplex

L'identification des gènes intervenant dans la biosynthèse des capsules polysaccharidiques des *P. multocida* A:1 (20) et B:2 (8) a fourni des informations permettant de déterminer la région codant la biosynthèse des 3 autres sérotypes (D, E, et F) (8). De plus, l'utilisation de la PCR multiplex spécifique de sérotype a permis de confirmer des résultats contradictoires relatifs au typage de quelques souches (46). Ces données ont permis d'identifier les séquences spécifiques de sérotype et de les utiliser comme amorces dans un système de PCR multiplex de typage capsulaire (8). Les amorces spécifiques de *P. multocida* sont incluses comme témoin interne pour l'identification d'espèce.

Séquences des amorces (8) :

PCR Multiplex capsulaire :	CAPA-FWD	5'-TGC-CAA-AAT-CGC-AGT-GAG-3'
	CAPA-REV	5'-TTG-CCA-TCA-TTG-TCA-GTG-3'
	CAPB-FWD	5'-CAT-TTA-TCC-AAG-CTC-CAC-3'
	CAPB-REV	5'-GCC-CGA-GAG-TTT-CAA-TCC-3'
	CAPD-FWD	5'-TTA-CAA-AAG-AAA-GAC-TAG-GAG-CCC-3'
	CAPD-REV	5'-CAT-CTA-CCC-ACT-CAA-CCA-TAT-CAG-3'
	CAPE-FWD	5'-TCC-GCA-GAA-AAT-TAT-TGA-CTC-3'
	CAPE-REV	5'-GCT-TGC-TGC-TTG-ATT-TTG-TC-3'
	CAPF-FWD	5'-AAT-CGG-AGA-ACG-CAG-AAA-TCA-G-3'
	CAPF-REV	5'-TTC-CGC-CGT-CAA-TTA-CTC-TG-3'
	KMT1T7	5'-ATC-CGC-TAT-TTA-CCC-AGT-GG-3'
	KMT1SP6	5'-GCT-GTA-AAC-GAA-CTC-GCC-AC-3'

Taille des fragments correspondants :

Sérogroupe A	CAPA-FWD/CAPA-REV	1044 pb
Sérogroupe B	CAPB-FWD/CAPB-REV	760 pb
Sérogroupe D	CAPD-FWD/CAPD-REV	657 pb
Sérogroupe E	CAPE-FWD/CAPE-REV	511 pb
Sérogroupe F	CAPF-FWD/CAPF-REV	851 pb

Conditions de réalisation de la PCR :

L'ADN matriciel est ajouté au mélange réactionnel pour PCR (volume total de 25 µl) contenant le tampon PCR (1×), 200 µM de chaque désoxynucléotide-triphosphate (dNTP), 2 mM de MgCl₂, 3,2 pmol de chaque amorce et 1 u de *Taq* ADN polymérase. Dans la publication d'origine (8), il est suggéré d'utiliser un programme de thermocyclage standard comme pour l'analyse PCR spécifique de *P. multocida*. Toutefois, la validation de la PCR multiplex indique que le programme de thermocyclage optimisé suivant devrait être employé pour le système de PCR GeneAmp 2440 de Perkin Elmer : une première dénaturation à 95 °C pendant 5 min ; 30 cycles à 95 °C pendant 30 s, à 55 °C pendant 30 s, et à 72 °C pendant 90 s ; suivis d'une dernière élongation à 72 °C pendant 5 min. L'électrophorèse en gel d'agarose est réalisée selon la technique précédemment décrite.

c) Analyse PCR spécifique du type-B causant la SH

L'identification présomptive de *P. multocida* type-B causant spécifiquement la SH est aussi possible par amplification PCR (9, 49). Une analyse comparative avec le génome de *Haemophilus influenzae* Rd indique que les régions d'ADN amplifiées dans les deux analyses sont étroitement proches en dépit de légères différences de spécificité. Jusqu'ici, la PCR spécifique du type B causant la SH (49) reste à 100 % spécifique des sérotypes des *P. multocida* isolées appartenant au type B causant la SH. Les cultures de type B dont l'antigène somatique prédominant est de type 2 ou 5 sont identifiées par l'amplification d'un fragment de ~620 pb avec les amorces KTSP61 et KTT72.

Séquences des amorces (49) :

PCR spécifique du type B causant la SH :	KTT72	5'-AGG-CTC-GTT-TGG-ATT-ATG-AAG-3'
	KTSP61	5'-ATC-CGC-TAA-CAC-ACT-CTC-3'

Les conditions de réalisation de la PCR spécifique du type B causant la SH sont identiques à celles décrites pour la PCR spécifique de *P. multocida*. Ces amorces ont été signalées utiles pour identifier les souches du sérogroupe B.

Les amorces spécifiques du type B causant la SH et les amorces spécifiques de *P. multocida* peuvent être aussi utilisées conjointement en PCR multiplex, réduisant de façon très importante le temps requis pour la détection de *P. multocida* et l'identification présomptive du sérotype. Les conditions de réalisation de la PCR multiplex sont les mêmes que celles précédemment décrites, excepté l'emploi de 3,2 pmol de chacune des 4 amorces et d'1 u de *Taq* ADN polymérase. L'emploi de la PCR multiplex spécifique de *P. multocida* et spécifique du type B causant la SH sur une bactérie suspecte peut permettre d'en confirmer l'identité et d'établir une présomption de sérotype en 3 à 4 h alors que les analyses biochimiques et le sérotypage conventionnel peuvent prendre jusqu'à 2 semaines.

d) PCR spécifique de *Pasteurella multocida* type A

Les amorces permettant le typage des souches du sérogroupe A avec plusieurs types somatiques ont été considérées utiles pour l'identification spécifique des isolats (24).

Amorces :

RGMA5	5'-AAT-GT-TTG-CGA-TAG-TCC-GTT-AGA-3'
RGMA6	5'-ATT-TGG-CGC-CAT-ATC-ACA-GTC-3'

Conditions de réalisation de la PCR :

L'ADN matriciel (50 ng) est ajouté au mélange réactionnel pour PCR (volume total de 25 µl) contenant le tampon PCR (1×), 200 µM de chacun des désoxynucléotide-triphosphates (dNTP), 1,5 mM de MgCl₂, 20 pmol de chaque amorce et 1 unité de *Taq* ADN polymérase. Les conditions d'amplification usuelles sont les suivantes : une première dénaturation de 5 min à 95 °C ; 30 cycles de 45 s à 95 °C, de 45 s à 56 °C, de

6 min à 72 °C. Les produits amplifiés sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose (gel d'agarose à 1,5 %) en tampon TBE (0,5×) pendant 2 h à 5 v/cm.

L'amplification de PCR donne un produit de 564 pb.

L'épreuve peut être appliquée directement sur une culture, sur un lysat de cellules bouillies et sur des tissus infectés.

e) Différenciation génotypique des isolats

Une fois que l'identification présomptive (ou définitive) a été faite, une différenciation plus poussée des isolats peut être réalisée par des méthodes de typage génotypiques (*genotypic fingerprinting methods*). L'analyse par endonucléase de restriction avec l'enzyme *HhaI* a prouvé son utilité pour caractériser les sérotypes de SH du type B. 20 profils d'ADN ont été ainsi distingués avec l'endonucléase *HhaI* parmi 71 isolats de *P. multocida* appartenant au sérotype capsulaire B. 13 profils distincts ont été individualisés parmi 54 isolats correspondant aux sérotypes B:2 ou B:2,5 incriminés dans la SH (54). En revanche, dans la même étude, un seul profil a été caractérisé avec l'endonucléase *HhaI* parmi 13 isolats appartenant au sérotype capsulaire E, tandis qu'une différenciation était possible en réalisant une digestion par l'endonucléase *HpaII*. *HpaII* semble donc générer des subdivisions plus fines que celles obtenues par l'emploi de *HhaI* (53). Le ribotypage et la séparation de l'ADN par électrophorèse en champ pulsé sont aussi des moyens utiles de différenciation des isolats des sérotypes B et E de *P. multocida* (47). L'AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) a été décrite comme une technique rapide et reproductible avec des indices élevés de discrimination des souches de *P. multocida* (2). Cependant, ces techniques sont en grande partie du domaine de la recherche et requièrent un équipement spécialisé. En outre, un profil n'est pas unique pour un pays d'origine ou une espèce hôte.

Le typage par PCR est réalisable par des laboratoires ayant la capacité à réaliser des analyses PCR, avec plusieurs méthodes auparavant utilisées pour différencier *P. multocida*. Le RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) et l'AP-PCR (*Arbitrarily Primed*) se sont révélés utiles pour l'étude épidémiologique d'isolats provenant de lapins (17) et pour la différenciation post-vaccinale d'isolats issus de dindes (26). L'analyse des séquences répétées par REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic*) de *P. multocida* s'est révélée utile pour différencier des isolats d'origine aviaire et porcine, néanmoins toutes les souches causant la SH analysées ont un profil semblable (48, 50). Une variabilité moléculaire a toutefois été trouvée récemment parmi des souches de *P. multocida* causant la SH appartenant au sérotype B. Le recours à la REP-PCR, l'ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus*) et la PCR n'utilisant qu'une seule amorce ont permis la différenciation génétique de 5 isolats du sérotype B pourtant indifférenciables sur la base de méthodes d'analyses conventionnelles (7). Les analyses RAPD et AP-PCR des isolats de *P. multocida* causant la SH n'ont pas été décrites antérieurement.

3. Épreuves sérologiques

Les épreuves sérologiques de détection des anticorps ne sont pas normalement utilisées pour le diagnostic. L'épreuve d'hémagglutination indirecte peut être néanmoins préconisée pour cet usage, en utilisant une méthode globalement similaire à celle précédemment décrite pour le typage capsulaire. Des titres élevés détectés par cette méthode sont indicateurs d'une récente exposition à la SH. Comme la SH survient principalement sur des animaux élevés dans des conditions d'élevage plutôt médiocres et dans des zones où les systèmes de notification des maladies sont aussi peu développés, il y a souvent un retard considérable dans la notification des cas. La mort survenant rapidement, les carcasses ne sont déjà plus utilisables pour les examens lorsque la notification est faite. Dans de telles conditions, de hauts titres d'anticorps de 1/160 jusqu'à 1/1 280 ou plus parmi les animaux contacts dans les troupeaux atteints sont significatifs d'une exposition récente à la SH et ont une valeur diagnostique.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Les vaccins utilisés contre la SH sont de 3 types : vaccins à agents inactivés, précipités à l'alun et à adjuvant huileux. Des vaccinations répétées sont nécessaires pour induire une protection suffisante avec les vaccins à agents inactivés. L'administration de vaccins à agents inactivés trop concentrés peut provoquer des chocs vaccinaux. Ces réactions sont moins fréquentes avec les vaccins précipités à l'hydroxyde d'alumine et inexistantes avec les vaccins à adjuvant huileux.

Un vaccin à agents vivant contre la SH préparé avec une souche de *P. multocida* B:3,4 avirulente (souche Fallow deer) a été utilisé au Myanmar dès 1989 pour contrôler la maladie chez des bovins et des buffles âgés de plus de 6 mois. Il est administré en aérosol par application intranasale (16, 32, 33). Ce vaccin a été recommandé par

l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) comme vaccin inoffensif et efficace à utiliser dans les pays asiatiques. Il n'existe toutefois aucun rapport faisant état de l'utilisation de ce vaccin dans d'autres pays et les vaccins tués sont les seules préparations employées dans les pays affectés par la SH. Un essai du vaccin a été conduit en Indonésie (40).

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 elles peuvent être complétées par des instructions nationales et régionales.

1. Gestion des semences bactériennes

a) Caractéristiques de la semence bactérienne

Un isolat local de *P. multocida* représentant le sérotype prévalent est utilisé. Une culture bien capsulée et stable produisant de grosses colonies d'environ 2 mm de diamètre sur gélose CSY au sang doit être entretenue. Les cultures de semence devraient être conservées en milieu de conservation (gélose nutritive semi-solide ensemencée par piqûre) à température ambiante ou sous forme de cultures lyophilisées.

b) Méthodes de culture

Un veau est infecté avec la culture, et, au plus tard 2 à 3 h après sa mort, du sang est prélevé aseptiquement dans le cœur et conservé à -20°C sous forme d'aliqots de 1 ml. Une partie aliquote fraîche est utilisée pour chaque nouveau lot de vaccin. Il est permis de réaliser 1 ou 2 sous-cultures à partir de cet aliqot si la taille des colonies ne diminue pas. Une fraction aliquote de sang est décongelée et étalée sur une gélose CSY au sang. La culture obtenue est testée par agglutination sur lame avec l'antisérum approprié. Une bonne culture correcte donnera de gros agglutinats floculaires en moins de 30 s. Une mauvaise culture donnera seulement une agglutination fine et granulaire.

Les lots de semence doivent répondre aux exigences suivantes. Ils doivent être :

- i) *Purs* : indemnes de tous agents contaminants.
- ii) *Inoffensifs* : ne produisant aucune réaction adverse chez l'espèce cible lorsqu'ils sont administrés selon les recommandations.
- iii) *Efficaces* : stimulant effectivement l'immunité comme indiqué par les tests d'activité.

2. Méthode de fabrication

Des suspensions bactériennes denses sont nécessaires pour la production des vaccins. La teneur bactérienne minimale devrait correspondre à un poids sec de 1,5 g par litre de suspension. Il existe deux méthodes pour produire des suspensions denses. La première consiste à réaliser une culture sur milieu solide en flacons de Roux et la récolter dans de l'eau salée physiologique formolée en ajustant la suspension bactérienne à la concentration désirée. C'est cependant une méthode laborieuse puisque chaque flacon doit être récolté séparément et faire l'objet d'un contrôle de pureté. La seconde méthode, recommandée, utilise de grandes cuves permettant une culture aérée dans un milieu spécifiquement adapté à *P. multocida*. Le milieu stérilisé approprié contient de l'hydrolysate de caséine (2 g), du saccharose (6 g), de l'extrait de levure (6 g), du chlorure de sodium (5 g), de l'hydrogénéorthophosphate de dipotassium anhydre (8,6 g), du dihydrogénéorthophosphate de potassium anhydre (1,36 g), et de l'eau distillée q.s.p. 1 litre. Une croissance dense est obtenue si la caséine, le saccharose et l'extrait de levure sont préparés sous forme concentrée, stérilisés par filtration ou par autoclavage pendant 10 min à 107°C , et transférés aseptiquement dans le tank préalablement stérilisé par la chaleur avec le reste des ingrédients.

Deux types de procédés d'aération sont possibles, par agitation circulaire (hélice) ou par diffusion gazeuse. L'air stérile est fourni par un compresseur. Dans l'aération circulaire, la culture est agitée grâce à la force centrifuge, qui provoque une cheminée d'aération (le vortex), alors que dans la diffusion gazeuse l'air est dispersé en fines bulles par un diffuseur (verre fritté). Une aération intermittente semble produire une croissance plus dense (45). Plus l'air est finement dispersé, meilleure est la croissance bactérienne. Des fermenteurs de 20 à 40 litres sont habituellement employés, et l'incubation est réalisée à 37°C . Dans les systèmes de culture continue, une fois qu'une densité maximale a été atteinte, habituellement dans un délai de 15 h, à peu près 25 % du volume de travail est récolté et remplacé d'heure en heure. Les récoltes des cultures continues sont réparties en volumes relativement petits dans des récipients séparés, mais après plusieurs jours, la densité bactérienne diminue, sans doute à la suite de la perte de l'antigène capsulaire. On préfère donc pour cette raison les cultures par lots. Si les récipients des cultures par lots sont inoculés à raison de 50 ml/litre de milieu, la turbidité maximale est atteinte en 15 à 18 h. La croissance peut être stoppée à ce moment par l'addition de formol à une concentration finale de 0,5 %. Ce procédé, qui utilise un inoculum important et grâce auquel la croissance est terminée au bout d'une

courte période, aide à minimiser les risques de contamination. La turbidité est normalisée par rapport à un témoin contenant l'équivalent en poids sec/volume de 1,5 g/litre.

Des cultures denses sont aussi obtenues en utilisant des fermenteurs, dans lesquels la stérilisation des tanks et la culture peuvent être réalisées *in situ*, avec des dispositifs automatiques régulant la température, le pH et l'aération. Les systèmes de stérilisation des liquides par filtration, pour les composants sensibles à la chaleur, peuvent aussi être inclus dans le fermenteur. Un fermenteur produisant des lots de 100 litres permettra d'obtenir un minimum de 66 000 doses (chacune de 3 ml) de vaccin à adjuvant huileux, voire bien plus si la densité obtenue est assez élevée pour permettre une dilution à une norme de référence équivalente à 1,5 g/litre, poids sec/volume.

Un vaccin à adjuvant huileux est obtenu en émulsifiant à volumes égaux une huile minérale légère et la suspension bactérienne avec 5 % de lanoline anhydre pure utilisée comme agent émulsifiant. L'huile minérale et la lanoline sont d'abord stérilisées et après refroidissement à 40 °C, le formol à 0,5 % est ajouté au mélange. La suspension bactérienne est ajoutée lentement et l'émulsification est poursuivie encore pendant 10 min. Après avoir été conservé durant la nuit, le mélange est re-émulsionné, mis en flacons et stocké à 4 °C pendant 2 semaines avant usage.

La préparation d'un vaccin précipité à l'alun implique un premier ajustement de la turbidité de la suspension par rapport au témoin de référence comme indiqué précédemment, et la dilution dans un volume équivalent de soluté salin physiologique formolé à 0,5 %. Le pH est ajusté à 6,5, et une solution chaude d'alun potassique est ensuite ajoutée de façon à obtenir une concentration finale d'alun de 1 %. Après une nuit de conservation sous agitation continue, le vaccin est mis en flacons pour emploi.

3. Contrôles en cours de fabrication

La concentration appropriée de la croissance bactérienne, la capsulation des bactéries, la pureté des cultures et l'efficacité de l'inactivation doivent faire l'objet d'un contrôle systématique.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests de contrôle de stérilité et d'absence de contamination des matériaux biologiques peuvent être trouvés au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Deux bovins séronégatifs sont vaccinés avec 2 fois la dose recommandée et observés pendant 10 à 14 jours en vue de détecter des effets adverses.

5 souris sont inoculées par voie intramusculaire avec 0,2 ml de vaccin chacune, et observées pendant 5 jours. Le sang de n'importe quelle souris qui meurt est cultivé en vue d'y détecter *P. multocida*.

c) Activité

Les contrôles d'activité peuvent être effectués par l'une ou l'autre des méthodes suivantes :

- i) vaccination de bovins suivie d'une épreuve virulente directe ou de tests de protection passive de la souris en utilisant les sérums des bovins. Ce procédé n'est pas toujours utilisable car les bovins mettent un temps assez long pour développer une immunité satisfaisante après administration d'un vaccin à adjuvant huileux ;
- ii) vaccination de lapins suivie d'une épreuve virulente directe ou test de protection passive de la souris en utilisant le sérum des lapins ; ou
- iii) tests d'activité sur souris, la méthode la plus aisée à réaliser des trois.

50 souris reçoivent 0,2 ml de vaccin par voie IM, chacune à deux reprises, à 14 jours d'intervalle. Au 21^e jour, elles sont réparties en 10 lots de 5, chacun étant testé respectivement avec les dilutions de 10^{-1} à 10^{-10} d'une culture en bouillon de la souche sauvage de 6 à 8 h ; 50 souris témoins non vaccinées sont aussi soumises à la même épreuve virulente, et toutes sont observées durant 5 jours. La dose létale médiane (DL_{50}) peut être alors calculée de manière à apprécier la dose suffisante pour protéger les bovins : les vaccins préparés de cette façon donnent au moins 10^4 unités protectrices chez les souris vaccinées.

d) Durée de l'immunité

Une seule dose de vaccin administrée à un jeune veau âgé de 4 à 6 mois protégera les animaux sensibles pendant 3 à 4 mois s'il s'agit d'un vaccin à l'alun, et 6 à 9 mois s'il s'agit d'un vaccin à adjuvant huileux.

e) Stabilité

L'émulsion dans un vaccin à adjuvant huileux devrait être d'un blanc pur, et devrait adhérer à la paroi de verre du flacon comme de la peinture. Si l'émulsion montre des signes d'altération, elle doit être écartée. La séparation d'une couche mince d'huile sur la surface est permise. Elle peut être conservée pendant 6 mois entre 4 et 8 °C sans perte significative d'activité. Elle ne doit pas être congelée. L'augmentation de la teneur en lanoline améliore la stabilité, mais aussi la viscosité, ce qui représente un inconvénient non négligeable. L'usage d'un autre agent émulsifiant comme l'« Arlacel » permet de produire des émulsions stables moins visqueuses.

f) Mode d'utilisation

Le vaccin devrait être administré par injection intramusculaire profonde. L'emploi de seringues en nylon de 5 ml pour un volume de 3 ml avec une aiguille de grosseur 14 ou 15 est conseillé. L'âge de 4 à 6 mois est recommandé pour la primovaccination. La vaccination prophylactique de routine requiert l'administration d'une simple dose de vaccin à adjuvant huileux entre 4 et 6 mois, un rappel 3 à 6 mois plus tard, et ensuite une revaccination annuelle. Lorsque les pratiques d'élevage ne permettent pas de vacciner individuellement les animaux aux moments appropriés, on recommande la vaccination annuelle de tous les animaux de plus de 4 mois d'âge, de préférence avant la saison de reproduction, et la vaccination 6 mois plus tard de tous les veaux de moins de 1 an. Lorsque des cas surviennent chez des animaux vaccinés, il est recommandé d'administrer une dose de vaccin à l'alun suivie d'une dose de vaccin à adjuvant huileux.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

La diffusion de vaccin à adjuvant huileux dans le tissu sous-cutané peut occasionnellement provoquer le développement d'un nodule fibreux au site d'injection. Des abcès peuvent parfois se former si les conditions de stérilité ne sont pas respectées, bien que la plupart des animaux soient résistants à de telles infections. Les vaccins de type APV peuvent occasionnellement provoquer des réactions de choc.

5. Contrôles du produit fini**a) Innocuité**

Voir Section C.4.b.

b) Activité

Voir Section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AITKEN W.A. (1940). So-called hemorrhagic septicaemia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **96**, 300–304.
2. AMONSIN A., WELLEHAN J.F.X., LI L.L., LABER J. & KAPUR V. (2002). DNA fingerprinting of *Pasteurella multocida* recovered from avian sources. *J. Clin. Microbiol.*, **4**, 3025–3031.
3. ANIMAL HEALTH INFORMATION SERVICES (1997). Deputy Commissioner (LH). Department of Animal Health, Ministry of Agriculture, Govt of India. New Delhi, India.
4. ANON (1981). Simple serological technique recommended for HS diagnosis. *Asian Livestock*, **6**, 41–42.
5. BAIN R.V.S., DE ALWIS M.C.L., CARTER G.R. & GUPTA B.K. (1982). Haemorrhagic Septicaemia. FAO Animal Production and Health Paper No. 33. FAO, Rome, Italy.
6. BAUER A.W., KIRBY W.M.M., SHERRIS J.C. & TURCK M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 493–496.

7. BISWAS A., SHIVACHANDRA S.B., SAXENA M.K., KUMAR A.A., SINGH V.P. & SRIVASTAVA S.K. (2004). Molecular variability among strains of *P. multocida* isolated from an outbreak of haemorrhagic septicaemia in India. *Vet. Res. Commun.*, **28**, 287–298.
8. BOYCE J.D., CHUNG J.Y. & ADLER B. (2000). Genetic organisation of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Vet. Microbiol.*, **72**, 121–134.
9. BRICKELL S.K., THOMAS L.M., LONG K.A., PANACCIO M. & WIDDERS P.R. (1998). Development of a PCR test based on a gene region associated with the pathogenicity of *Pasteurella multocida* serotype B:2, the causal agent of haemorrhagic septicaemia in Asia. *Vet. Microbiol.*, **59**, 295–307.
10. CARIGAN M.J., DAWKINS H.J.S., COCKRAM E.A & HANSEN A.T. (1991). *P. multocida* septicaemia in fallow deer. *Aust. Vet. J.*, **68**, 201–203.
11. CARTER G.R. (1955). A haemagglutination test for the identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.*, **16**, 481–484.
12. CARTER G.R. (1982). Whatever happened to hemorrhagic septicaemia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **180**, 1176–1177.
13. CARTER G.R. & CHENGAPPA M.M. (1980). Hyaluronidase production by type B *Pasteurella multocida* from cases of haemorrhagic septicaemia. *J. Clin. Microbiol.*, **11**, 94–96.
14. CARTER G.R. & CHENGAPPA M.M. (1981). Identification of type B and E *Pasteurella multocida* by counterimmuno-electrophoresis. *Vet. Rec.*, **108**, 145–146.
15. CARTER G.R. & DE ALWIS M.C.L. (1989). Haemorrhagic septicaemia. In: *Pasteurella* and Pasteurellosis, Adlam C. & Rutter J.M., eds. Academic Press, London, UK, 131–160.
16. CARTER G.R., MYINT A., VAN KHAR R. & KHIN A. (1991). Immunisation of cattle and buffaloes with live haemorrhagic septicaemia vaccine. *Vet. Rec.*, **129**, 203.
17. CHASLUS-DANCLA E., LESAGE-DESCAUSES M.C., LEROY-SETRIN S., MARTEL J.L., COUDERT P. & LAFONT J.P. (1996). Validation of random amplified polymorphic DNA assays by ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, **52**, 91–102.
18. CHRISTENSEN H., ANGEN O., OLSEN J.E. & BISGAARD M. (2004). Revised description and classification of atypical isolates of *Pasteurella multocida* from bovine lungs based on genotypic characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium*. *Microbiol.*, **150**, 1757–1767.
19. CHRISTENSEN H., BISGAARD M., ANGEN O., FREDERIKSEN W. & OLSEN J. E. (2005). Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 259–270.
20. CHUNG J.Y., ZHANG Y. & ADLER B. (1998). The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. *FEMS Microbiol. Lett.*, **166**, 289–296.
21. DE ALWIS M.C.L. (1984). Haemorrhagic septicaemia in cattle and buffaloes. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **3**, 707–730.
22. DE ALWIS M.C.L. (1992). Haemorrhagic septicaemia – a general review. *Br. Vet. J.*, **148**, 99–112.
23. DUTTA T.K., SINGH V.P. & KUMAR A.A. (2001). Rapid and specific diagnosis of animal pasteurellosis by using PCR assay. *Ind. J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.*, **22**, 43–46.
24. GAUTAM R., KUMAR A.A., SINGH V.P., SINGH VIJENDRA P., DUTTA T.K. & SHIVCHANDRA S.B. (2004). Specific identification of *Pasteurella multocida* serogroup A isolates by PCR assay. *Res. Vet. Sci.*, **76**, 179–185.
25. 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.
26. HOPKINS B.A., HUANG T.H.M. & OLSON L.D. (1998). Differentiating turkey postvaccination isolants of *Pasteurella multocida* using arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **42**, 265–274.

27. KEHRENBURG C., SCHULZE-TANZIL G., MARTEL J.-L., DANCLA E.C. & SCHWARZ S. (2001). Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet. Res.*, **32**, 323–339.
28. KASTEN R.W., CARPENTER T.E., SNIPES K.P. & HIRSH D.C. (1997). Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in turkey flocks by use of the polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **41**, 676–682.
29. KUMAR A.A., HARBOLA P.C., RIMLER R.B. & KUMAR P.N. (1996). Studies on *Pasteurella multocida* isolates of animal and avian origin from India. *Ind. J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.*, **17**, 120–124.
30. MIFLIN J.K. & BLACKALL P.J. (2001). Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **33**, 216–221.
31. MUSTAFA A.A., GHALIB H.W. & SHIGIDI M.T. (1978). Carrier rate of *Pasteurella multocida* in a cattle herd associated with an outbreak of haemorrhagic septicaemia in the Sudan. *Br. Vet. J.*, **134**, 375–378.
32. MYINT A., JONES T.O. & NYUNT H.H. (2005). Safety, efficacy and cross-protectivity of a live intranasal aerosol haemorrhagic septicaemia. *Vet. Rec.*, **156**, 41–45.
33. MYINT A & NUNT H.H. (1990). Intranasal aerosol live vaccine prevents haemorrhagic septicaemia for one year. *Myanmar Vet. J.*, October 1999 (Annual conference edition), 33–35.
34. NAMIOKA S. (1978). *Pasteurella multocida*. Biochemical characteristics and serotypes. In: *Methods in Microbiology*, 10. Academic Press, London, UK, 272–292.
35. NAMIOKA S. & MURATA M. (1961). Serological studies on *Pasteurella multocida*. I: a simplified method of capsular typing of the organism. *Cornell Vet.*, **51**, 498–507.
36. NAMIOKA S. & MURATA M. (1961). Serological studies on *Pasteurella multocida*. II: characteristics of the somatic (O) antigen of the organism. *Cornell Vet.*, **51**, 507–521.
37. NAMIOKA S. & MURATA M. (1961). Serological studies on *Pasteurella multocida*. III. O antigenic analysis of cultures isolated from various animals. *Cornell Vet.*, **51**, 522–528.
38. NATALIA L. & PRIADI A. (2001). Polymerase chain reaction optimisation for the detection of *Pasteurella multocida* B:2, the causative agent of haemorrhagic septicaemia. *J. Ilmu. Terna. Dan Veteriner.*, **6**, 280–284.
39. NEUMANN S., LEEB T. & BRENIG B. (1998). Vergleich zwischen PCR und kultureller Untersuchung zum Nachweis von Infektionen mit *Pasteurella multocida* beim Hund (Comparison between PCR and microbiological assay for the detection of *Pasteurella multocida* in the dog [in German]). *Kleintierpraxis*, **43**, 69–74.
40. PRIADI A. & NATALIA L. (2001). Protection of a live *Pasteurella multocida* B: 3.4 vaccine against haemorrhagic septicaemia. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, **7**, 55–61.
41. ROSEN M.N. (1981). *Pasteurellosis Infectious Diseases of Wild Animals*, Second Ed. Davis J.B., Karstak L.H. & Trainer D.O., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 244–252.
42. SAWADA T., RIMLER R.B. & RHOADES K.P. (1985). Haemorrhagic septicaemia: naturally acquired antibodies against *Pasteurella multocida* types B and E in calves in the United States. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 1247–1250.
43. SHIVSHANKARA N., SAXENA M.K. & SINGH V.P. (2001). Rapid diagnosis of haemorrhagic septicaemia by PCR assay. *Ind. Vet. J.*, **78**, 101–103.
44. SINGH V.P., KUMAR A.A., SRIVASTAVA S.K. & RATHORE B.S. (1996). Significance of HS in Asia: India. International Workshop on Diagnosis and Control of HS. Bali, Indonesia, Indonesian Department of Agriculture, 28–30 May, 1999, p.16.
45. THOMAS J. (1968). Studies on haemorrhagic septicaemia oil adjuvant vaccine. I. Methods of production. *Kajian Vet. Malaysia–Singapore*, **1**, 152–158.
46. TOWNSEND K.M., BOYCE J.D., CHUNG J.Y., FROST A.J. & ADLER B. (2000). Genetic organisation of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 924–929.

47. TOWNSEND K.M., DAWKINS H.J.S. & PAPADIMITRIOU J.M. (1997). Analysis of haemorrhagic septicaemia-causing isolates of *Pasteurella multocida* by ribotyping and field alternation gel electrophoresis (FAGE). *Vet. Microbiol.*, **57**, 383–395.
48. TOWNSEND K.M., DAWKINS H.J.S. & PAPADIMITRIOU J.M. (1997). REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates that cause haemorrhagic septicaemia. *Res. Vet. Sci.*, **63**, 151–155.
49. TOWNSEND K.M., FROST A.J., LEE C.W., PAPADIMITRIOU J.M. & DAWKINS H.J.S. (1998). Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 1096–1100.
50. TOWNSEND K.M., O'BOYLE D., PHAN T.T., HANH T.X., WIJewardana T.G., WILKIE I., TRUNG N.T. & FROST A.J. (1998). Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. *Vet. Microbiol.*, **63**, 205–215.
51. WIJewardana T.G., DE ALWIS M.C.L. & BASTIANZ H.L.G. (1986). Cultural, biochemical and pathogenicity studies on strains of *Pasteurella multocida* isolated from carrier animals and outbreaks of haemorrhagic septicaemia. *Sri Lanka Vet. J.*, **34**, 43–57.
52. WIJewardana T.G., DE ALWIS M.C.L. & VIPULASIRI A.A. (1982). An agar gel diffusion test for rapid identification of *Pasteurella multocida* type B (Carter). *Sri Lanka Vet. J.*, **30**, 12–14.
53. WILSON M.A., DUNCAN R.M., NORDHOLM G.E. & BERLOWSKI B.M. (1995). *Pasteurella multocida* isolated from wild birds of North America; A serotype and DNA fingerprint study of isolates from 1978 to 1993. *Avian Dis.*, **39**, 587–593.
54. WILSON M.A., RIMLER R.B. & HOFFMAN L.J. (1992). Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup B and E *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1518–1524.

*

* *

RHINOTRACHÉITE INFECTIEUSE / VULVOVAGINITE INFECTIEUSE PUSTULEUSE

RÉSUMÉ

Définition de la maladie : la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR)/vulvovaginite infectieuse pustuleuse (IPV), provoquée par l'herpèsvirus bovin 1 (BoHV-1), est une maladie des bovins domestiques et sauvages. Le virus est réparti dans le monde entier, mais a été éradiqué en Autriche, au Danemark, en Finlande, en Italie (province de Bolzano), en Norvège, en Suède, et en Suisse. D'autre part des programmes de contrôle sont en cours dans d'autres pays.

Description de la maladie : la maladie est caractérisée par des signes cliniques localisés au niveau du tractus respiratoire supérieur, tels qu'un jetage nasal (muco)purulent et de la conjonctivite. Les signes généraux de la maladie sont de la fièvre, de l'abattement, de l'inappétence, des avortements et une diminution de la production laitière. Le virus peut également infecter la région génitale et causer une vulvovaginite/balanoposthite pustuleuse. Les examens post mortem révèlent des lésions de rhinite, laryngite et trachéite. Le taux de mortalité est faible. Beaucoup d'infections se déroulent de manière subclinique. Des infections bactériennes secondaires peuvent mener à une maladie respiratoire plus grave.

Identification de l'agent pathogène : le virus peut être isolé à partir d'écouillons nasaux, ou génitaux à partir d'animaux atteints de vulvovaginite ou de balanoposthite, prélevés pendant la phase aiguë de l'infection ainsi que dans divers organes prélevés post mortem.

Différents types de cultures cellulaires d'origine bovine sont utilisés pour réaliser l'isolement viral, par exemple des cellules secondaires de poumon ou de rein ou encore la lignée cellulaire rénale bovine Madin-Darby. Le virus est responsable d'un effet cytopathogène (ECP) 2 à 4 jours après l'infection. Le virus est identifié par des techniques de séroneutralisation (SN) ou de détection d'antigène utilisant des antisérums monospécifiques ou des anticorps monoclonaux (AcM). Les isolats de BoHV-1 peuvent être sous-typés en réalisant un profil de restriction de l'ADN viral : sous-type 1.1, 1.2 et 1.3. Les isolats de BHV 1.2 peuvent être à leur tour subdivisés en 2a et 2b. Le virus connu auparavant comme BHV 1.3, un agent neuropathogène, est actuellement classé comme BHV-5.

Des méthodes de détection de l'ADN viral ont été développées, et la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) est de, plus en plus, utilisée dans les diagnostics de routine.

Épreuves sérologiques : la méthode de séroneutralisation virale et les diverses méthodes d'analyses par réaction immuno-enzymatique (ELISA) sont les techniques les plus largement répandues pour la détection d'anticorps. Par la méthode ELISA, les anticorps peuvent être détectés dans le sérum et dans le lait mais avec une moindre sensibilité.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : des vaccins atténués et inactivés sont disponibles. Les vaccins doivent protéger les bovins contre les signes cliniques en cas d'infection, mais également réduire la circulation virale au sein de l'exploitation. Les vaccins ne doivent induire ni maladie, ni avortement, ni aucune réaction locale ou générale, et doivent être génétiquement stables. Des vaccins marqués à base de BoHV-1 dont la glycoprotéine E a été délétée sont maintenant en général disponibles. L'utilisation d'une méthode ELISA mettant en évidence la glycoprotéine E (gE) permet de distinguer les animaux infectés des animaux vaccinés à l'aide de vaccins marqués.

A. INTRODUCTION

La rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR)/vulvovaginite infectieuse pustuleuse (IPV), provoquée par l'herpèsvirus bovin 1 (BoHV-1), est une maladie des bovins domestiques et sauvages. Le BoHV-1 est un virus de la famille des *Herpesviridae*, de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* et du genre *Varicellovirus*. Le génome viral se compose d'ADN bicaténaire qui code environ 70 protéines parmi lesquelles 33 sont des protéines structurales et jusqu'à 15 protéines sont non-structurales. Les glycoprotéines situées sur l'enveloppe virale jouent un rôle important dans les processus de pathogénie et d'immunité. Le BoHV-1 peut être différencié en différents sous-types : 1.1, 1.2a, 1.2b et 1.3 (25). Le BoHV-1.3 qui est un agent neuropathogène a été classé récemment en tant que BoHV-5 (21). Les sous-types du BoHV-1.2 peuvent se révéler moins virulents que le sous-type 1.1 (11).

Après une période d'incubation de 2 à 4 jours, les signes cliniques deviennent évidents : jetage nasal séreux, ptialisme, fièvre, inappétence, et abattement. En quelques jours, le larmolement et le jetage deviennent mucopurulents. Dans les exploitations où la monte naturelle est utilisée, l'infection génitale peut mener à la vulvovaginite ou balanoposthite pustuleuse. Beaucoup d'infections sont subcliniques (41).

Les cas d'infections non compliquées à BoHV-1 de type respiratoire ou génital se résolvent en général en 5 à 10 jours.

Le virus pénètre dans l'organisme au niveau des naseaux et se réplique à des titres élevés au niveau des cellules de la muqueuse respiratoire supérieure et dans les amygdales. Il se dissémine ensuite aux conjonctives et par transport axonal jusqu'au ganglion trijumeau. Après l'infection génitale, le BoHV-1 se multiplie au niveau des cellules de la muqueuse génitale ou du prépuce, et s'installe à l'état latent au niveau du ganglion sacré. L'ADN viral persiste dans les neurones du ganglion probablement pendant toute la vie de l'animal. Si l'animal est soumis à un stress, comme le transport ou la parturition, il peut se produire une réactivation du virus latent. Le virus peut alors être excrété par intermittence dans l'environnement.

L'infection induit normalement une réponse immune de type humorale avec production d'anticorps ainsi qu'une réponse immune de type cellulaire dans les 7 à 10 jours qui suivent l'infection. La réponse immune persiste normalement durant toute la vie de l'individu, bien qu'elle puisse tomber au-dessous des seuils de détection de certains tests de diagnostic. Des anticorps maternels sont transférés aux jeunes veaux par l'intermédiaire du colostrum et ces derniers sont par conséquent protégés contre la maladie induite par le virus BoHV-1 (24). Les anticorps maternels ont une demi-vie biologique d'environ 3 semaines, mais peuvent être détectés de temps en temps chez les animaux jusqu'à 9 mois, mais rarement chez les animaux au-dessus de cet âge.

Le virus existe dans le monde entier, partout où l'on trouve des bovins domestiques. D'autres ruminants peuvent être infectés par le BoHV-1. Après infection, l'excrétion virale via le jetage est détectée pendant 10 à 14 jours, avec des titres maximaux de 10^8 à 10^{10} DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) par ml de sécrétion nasale. Le sperme d'un taureau infecté peut contenir du BoHV-1, ce virus peut dès lors être transmis par monte naturelle et par insémination artificielle (28).

Le contrôle du BoHV-1 au sein d'une exploitation est basé sur un minimum de mesures hygiéniques prises au sein de cette exploitation. Dans le meilleur des cas, une période de quarantaine de 2 à 3 semaines est imposée pour les animaux entrant dans l'exploitation. Seuls les animaux séronégatifs envers le BoHV-1 seront admis au sein de l'exploitation. Les vaccins empêchent habituellement le développement de signes cliniques graves et réduisent l'excrétion du virus post-infection, mais ne préviennent pas l'infection. Plusieurs campagnes d'éradication ont été ou sont menées actuellement dans différents pays ; elles comprennent des programmes d'identification-abattage et/ou des campagnes de vaccination (voir Section C).

La suspicion d'une infection par le BoHV-1 peut se faire sur base des signes cliniques, lésionnels et épidémiologiques. Cependant, pour poser un diagnostic définitif, on doit recourir à des examens de laboratoire. Une procédure complète de diagnostic dans le laboratoire est réalisée détectant le virus causal (ou les composants viraux) et les anticorps spécifiques qu'il induit.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

a) La récolte et le traitement des échantillons (prélèvements) :

Les écouvillons nasaux sont récoltés sur plusieurs animaux (de 5 à 10) en phase précoce (aiguë) de l'infection. Ces animaux présentent un jetage plutôt de type séreux que mucopurulent. Dans les cas de vulvovaginite et de balanoposthite, les écouvillons sont prélevés au niveau génital. Les écouvillons doivent

être vigoureusement frottés contre les surfaces muqueuses. Le prépuce peut aussi être lavé avec une solution saline, et le liquide de lavage est récolté. Les échantillons sont alors mis en suspension dans un milieu de transport (milieu de culture cellulaire contenant des antibiotiques ainsi que 2 à 3 % de sérum bovin pour éviter l'inactivation virale), refroidi à 4 °C, et sont rapidement envoyés au laboratoire.

À l'autopsie, les muqueuses du tractus respiratoire, un morceau d'amygdale, de poumon et des nœuds lymphatiques bronchiques sont prélevés afin de réaliser une détection virale. Dans les cas d'avortement, le foie, les poumons, la rate et les reins du fœtus ainsi que le placenta et les cotylédons sont examinés. Les échantillons doivent être envoyés au laboratoire, sur glace, le plus rapidement possible.

À leur arrivée au laboratoire, les écouvillons nasaux sont agités dans le milieu de transport pour éluer le virus et sont laissés à température ambiante pendant 30 min. L'écouvillon est retiré du milieu de transport, qui est alors centrifugé à 1 500 *g* pendant 10 min. Les tissus prélevés sont homogénéisés et suspendus à raison de 10 à 20 % dans un milieu de culture cellulaire puis centrifugés à 1 500 *g* pendant 10 min. Les surnageants de ces échantillons sont filtrés à travers des filtres de 0,45 µm qui sont utilisés pour les isolements viraux.

L'isolement viral dans le sperme nécessite des adaptations car le liquide séminal contient des enzymes et d'autres facteurs cytotoxiques et inhibiteurs de la réplication virale (voir ci-dessous).

b) Isolement viral

L'isolement viral peut être réalisé sur de nombreux types de culture cellulaire. Des lignées de cellules bovines de première ou seconde explantation (rénales, pulmonaires ou testiculaires), des lignées cellulaires de poumon fœtal, de cornets nasaux ou de trachée ainsi que des lignées cellulaires établies comme la lignée cellulaire rénale bovine Madin-Darby sont utilisables. Les cellules peuvent être cultivées sur tubes en verre ou plastique, sur des plaques ou des boîtes de culture. Lorsqu'une plaque 24 puits est utilisée, 100 à 200 µl de surnageant, décrit ci-dessus, sont inoculés au tapis cellulaire. Après une période d'absorption de 1 h, le tapis cellulaire est rincé et un milieu de croissance est alors ajouté. Le sérum ajouté dans le milieu de croissance doit être dépourvu d'anticorps anti-BoHV-1. Les cultures cellulaires sont observées chaque jour pour juger de l'apparition d'un effet cytopathogène (ECP) qui apparaît dans les 3 jours après inoculation. Cet effet est caractérisé par des amas cellulaires en grappe où les cellules rondes sont amassées autour d'un trou dans le tapis cellulaire ; parfois des cellules géantes avec de nombreux noyaux peuvent être observées. Une certaine expérience est requise pour pouvoir reconnaître ce schéma caractéristique. Quand, après 7 jours en culture de cellule, aucun ECP n'est apparu, un passage en aveugle doit être réalisé. La culture cellulaire est congelée-décongelée et clarifiée par centrifugation, le surnageant est alors utilisé pour inoculer une nouvelle culture cellulaire (6, 9).

Pour identifier le virus qui induit l'ECP, comme le BoHV-1, le surnageant de la culture doit être neutralisé par un antisérum spécifique du BoHV-1 ou neutralisé par les anticorps monoclonaux (AcM). Pour cette manipulation, une série de dilutions 10 en 10 est réalisée sur le surnageant et pour chaque dilution l'antisérum spécifique du BoHV-1 ou le sérum « témoin négatif » sont ajoutés. Les cultures sont alors placées à l'incubateur à 37 °C pendant 1 h, les mélanges sont ensuite déposés sur une culture cellulaire et, 3 à 5 jours plus tard, l'index de neutralisation est calculé. L'index de neutralisation est le titre viral (en base log₁₀) du témoin négatif moins le titre viral de la culture virale en présence d'antisérum spécifique. Si l'index de neutralisation est supérieur à 1,5, l'échantillon peut être considéré comme étant positif au BoHV-1. Pour diminuer la procédure d'isolement viral, deux échantillons peuvent être inoculés en culture cellulaire, un étant pré-incubé avec un antisérum spécifique et l'autre étant pré-incubé avec un sérum témoin négatif. Si l'ECP est inhibé par l'antisérum spécifique, l'échantillon peut être considéré comme du BoHV-1.

Une méthode alternative d'identification virale se fait par la démonstration directe de l'antigène BoHV-1 en culture cellulaire autour des zones d'ECP (plages de lyse virale) par une technique d'immunofluorescence ou d'immunoperoxydase (16) à l'aide d'antisérums spécifiques conjugués ou d'AcM.

- **Isolement viral à partir du sperme (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)**

Une paille, 0,5 ml, de sperme dilué ou 0,02 ml de sperme brut doivent être testés avec deux passages en culture de cellules. Pour le sperme congelé, une approximation devrait être faite pour s'assurer que l'équivalent de 0,05 ml de sperme brut est analysé. Le sperme brut est en général cytotoxique et devrait être prédilué avant d'être ajouté à la culture de cellules. Un problème similaire peut parfois survenir avec le sperme congelé. Une méthode expérimentale est décrite ci-dessous.

- **Protocole**

- i) Diluer 200 µl de sperme frais dans 2 ml de sérum fœtal bovin (sérum dépourvu d'anticorps anti-BoHV-1) avec antibiotiques ;

- ii) Mélangez vigoureusement et laissez 30 min à température ambiante ;
- iii) Inoculer 1 ml du mélange sperme/sérum bovin sur un tapis monocouche de cellules sensibles (voir plus haut) sur une plaque à 6 puits de culture cellulaire ;
- iv) Incuber la plaque pendant 1 h à 37 °C ;
- v) Eliminer le milieu et laver le tapis cellulaire 2 fois avec 5 ml de milieu de culture, ajouter ensuite 5 ml de milieu de culture dans chaque puits ;
- vi) Inclure les témoins positif et négatif de BoHV-1 dans l'épreuve. Une extrême précaution doit être prise pour éviter les contaminations dans les puits à tester par le témoin positif, par exemple en ajoutant le témoin en dernier et en utilisant des plaques séparées ;
- vii) Observation quotidienne des plaques au microscope pour repérer des ECP. Si un ECP apparaît, des épreuves de confirmation pour le BoHV-1 sont réalisées par séroneutralisation (SN) spécifique ou par méthode de caractérisation immunologique (voir ci-dessus) ;
- viii) Si aucun ECP n'apparaît après 7 jours, les cultures sont congelées et décongelées, clarifiées par centrifugation et le surnageant est utilisé pour inoculer de nouvelles monocouches cellulaires ;
- ix) L'échantillon est considéré comme négatif s'il n'y a pas d'évidence d'ECP après 7 jours d'incubation en culture cellulaire.

c) Détection de l'antigène viral

Les écouvillons nasaux, oculaires et génitaux peuvent être appliqués sur une lamelle couvre-objet ou, après centrifugation, le culot cellulaire (voir Section B.1.a) peut être déposé sur des lamelles couvre-objet. Ces lamelles sont soumises à une épreuve directe ou indirecte utilisant des anticorps fluorescents. Dans l'épreuve d'immunofluorescence directe, l'antisérum est monospécifique et conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine, tandis que dans l'épreuve d'immunofluorescence indirecte, c'est un second anticorps, anti-immunoglobuline d'espèce, qui est conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine. Pour obtenir les meilleurs résultats, il est nécessaire d'échantillonner plusieurs animaux du troupeau présentant de la fièvre ou un léger jetage de type séreux. Les frottis doivent être séchés et fixés dans l'acétone dans les 24 h. Les frottis qui proviennent d'échantillon d'animaux présentant un jetage purulent ou hémorragique sont souvent négatifs (37). L'avantage de cette technique de détection antigénique est qu'elle peut fournir le diagnostic le jour du prélèvement. Cependant la sensibilité de cette procédure est plus faible que pour la technique d'isolement viral (9). Des témoins positif et négatif doivent être inclus pour chaque épreuve.

Les tissus prélevés *post mortem* peuvent être examinés afin d'y détecter la présence d'antigène de BoHV-1 par épreuve d'immunofluorescence sur des coupes d'organes congelés. L'immunohistochimie est également employée ; cette technique offre l'avantage de pouvoir localiser le virus au sein de l'organisme. Les AcM sont de plus en plus utilisés pour la détection d'antigènes de BoHV-1, menant à une amélioration de la spécificité de l'épreuve. Cependant, de tels AcMs doivent être soigneusement sélectionnés, en effet ils doivent être dirigés directement contre les épitopes conservés qui sont présents à la surface de tous les isolats de BoHV-1.

Une autre technique pour détecter rapidement l'antigène viral est l'utilisation de la méthode immuno-enzymatique (ELISA). Les antigènes peuvent être complexés par des anticorps mono ou polyclonaux qui tapissent une surface solide, habituellement les puits d'une microplaque. Des titres antigéniques équivalents à 10^4 – 10^5 DICT₅₀ de BoHV-1 sont exigés pour obtenir un taux élevé de résultats positifs (7). Les titres mentionnés ne sont pas exagérément hauts, en effet des titres de 10^8 – 10^9 DICT₅₀/ml de fluide nasal peuvent être excrétés par les animaux 3 à 5 jours après l'infection par BoHV-1. La sensibilité peut être augmentée par des systèmes d'amplification (voir réf. 10 pour un exemple).

Les avantages des méthodes de détection antigénique sur les techniques d'isolement viral tiennent au fait que l'on peut se dispenser de l'équipement de culture cellulaire et que le diagnostic de laboratoire peut être posé en 1 jour. Les inconvénients de cette méthode sont la faible sensibilité de détection directe d'antigène et le matériel supplémentaire par rapport à l'isolement viral, si l'isolat est requis pour d'autres expériences.

d) Détection de l'acide nucléique

Pendant la décennie passée, de nombreuses méthodes de mise en évidence de l'ADN du BoHV-1 dans des échantillons cliniques ont été décrites, incluant l'hybridation ADN–ADN et la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR). La PCR est également très utilisée dans les procédures courantes de diagnostic (26). Comparée à la méthode d'isolement viral, la PCR possède les principaux avantages d'être plus rapide et plus sensible : la PCR peut être réalisée en 1 à 2 jours. Cette méthode permet aussi de détecter l'ADN viral au sein des ganglions nerveux sensitifs infectés de manière latente (38). L'inconvénient de cette méthode est qu'elle est fortement encline à la contamination et donc des mesures doivent être

prises pour éviter les résultats faux positifs. Les risques de contamination sont particulièrement réduits avec les nouvelles techniques PCR, telles que la PCR en temps réel ou la PCR quantitative (1, 20).

Jusqu'à présent la technique de PCR a été utilisée pour détecter l'ADN du BoHV-1 dans des échantillons de spermes infectés de manière artificielle (19) ou naturelle (38). Les chercheurs ont constaté qu'il était important d'optimiser complètement les conditions de PCR, y compris la préparation des échantillons, la concentration en Mg^{2+} , les amorces et la Taq polymérase, ainsi que les programmes des cycles. La région cible de l'amplification doit être présente dans toutes les lignées de BoHV-1, et la séquence nucléotidique doit être conservée. Les gènes TK, gB, gC, gD et gE ont été utilisés comme cible pour l'amplification PCR. Les PCR basées sur la détection des séquences de gE peuvent être utilisées pour faire la différence entre le virus sauvage et la souche vaccinale délétée pour gE (14, 35). La différenciation entre l'infection par des souches IBR virulentes et une autre souche virale vivante atténuée n'est pas possible par technique PCR. Des PCR ont été développées pour faire la différence entre le BoHV-1 et le BoHV-5 (2, 33).

Expérimentalement, on a démontré que la PCR était plus sensible que l'isolement viral : cette méthode détecte, par exemple, 5 fois plus d'échantillons positifs de sperme dilué en jaune d'œuf et provenant de taureaux expérimentalement infectés que ne le fait la technique d'isolement viral (39). En outre, cette technique PCR a un seuil de détection de seulement 3 molécules. Néanmoins, des résultats faux négatifs ne peuvent être exclus. Afin d'identifier les possibles résultats faux négatifs, il est recommandé d'introduire un étalon dans le tube de réaction de l'échantillon de sperme avec les mêmes amorces. Cet étalon peut être élaboré, par exemple, en insérant un fragment de 100 paires de bases dans la région cible. Cet étalon témoin rend possible la semi-quantification de la quantité d'ADN qui est détectée (33, 38). Lorsqu'un témoin interne est utilisé, il est recommandé de faire de nombreux tests afin de s'assurer que l'amplification du témoin interne n'interfère pas avec le diagnostic en cours réalisé par la PCR et ne diminue pas, de ce fait, la sensibilité (voir aussi Chapitre 1.1.5., « Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses »).

e) Réaction d'amplification en chaîne par polymérase en temps réel (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

La méthode de PCR en temps réel a été mise au point pour la détection du BoHV-1 dans le sperme de bovin dilué commercialisé. La méthode a été validée en accord avec le Chapitre 1.1.5.. Il a été notamment mené une large comparaison inter-laboratoires qui comprenait six laboratoires collaborateurs ayant le statut de spécialiste du diagnostic de l'IBR.

De nombreuses études ont montré que les épreuves PCR sont plus sensibles que l'isolement du virus (36, 39, 42, 47). L'épreuve de PCR en temps réel a été utilisée pour le dépistage de BoHV-1 et BoHV-5 chez des bovins expérimentalement infectés et chez des souris (1, 20) et des épreuves de PCR conventionnelles ont été utilisées pour la détection de l'ADN de BoHV-1 dans des échantillons de sperme de bovins naturellement ou expérimentalement infectés (8, 15, 23, 38, 44, 45, 47, 49). Classiquement, les produits amplifiés par PCR sont reconnus par une analyse en gel d'électrophorèse (32). Des amorces spécifiques ont été sélectionnées pour amplifier différentes parties conservées des gènes des glycoprotéines de BoHV-1, notamment le gène de la glycoprotéine B (gB) (15, 34), le gène de la gC (36, 39), le gène de la gD (36, 47), le gène de la gE (15) et le gène de la thymidine kinase (tk) (26, 50).

La méthode de PCR en temps réel diffère de la PCR classique par le fait que les produits d'amplification sont détectés au cours de l'amplification par l'hybridation avec une sonde, ce qui renforce la spécificité de l'épreuve. Les PCR en temps réel présentent plusieurs avantages par rapport à la PCR classique. Les épreuves PCR en temps réel utilisant une seule paire d'amorces ont une sensibilité proche voire égale à celle des méthodes de PCR nichées avec un risque de contamination nettement plus faible puisque l'amplification et la détection sont effectuées simultanément. En outre, avec une PCR en temps réel, il est aussi possible de pratiquer une analyse quantitative.

La technique de PCR en temps réel décrite ci-dessous utilise une paire d'amorces spécifiques d'une zone cible de l'ADN viral et d'une sonde marquée en 5' (TaqMan) pour la détection des produits d'amplification. La sonde moléculaire est une séquence nucléotidique spécifique monobrin marquée avec deux fluorochromes différents, la 5-carboxyfluorescéine (FAM) à l'extrémité 5', et la 6-carboxy-tétraméthylrhodamine à l'extrémité 3'. Cette épreuve PCR en temps réel est conçue pour détecter l'ADN viral de toutes les souches de BoHV-1, y compris les sous-types 1 et 2 à partir de sperme de bovin dilué. L'épreuve amplifie sélectivement une séquence de 97 paires de bases du gène de la glycoprotéine B (gB). Les détails concernant les amorces et les sondes sont donnés dans le protocole ci-dessous.

• Préparation des échantillons, du matériel et des réactifs

- i) Les échantillons utilisés dans ce test sont typiquement des échantillons de sperme dilué conservés dans l'azote liquide. Les échantillons peuvent être transportés au laboratoire dans l'azote liquide ou à 4 °C, puis conservés dans l'azote liquide ou à -70 °C (conservation de longue durée) ou à 4 °C

(conservation de courte durée). La conservation de la semence à 4 °C pour une courte période (inférieure à 7 jours) ne semble pas modifier le résultat de la PCR.

- ii) Il convient de tester 3 paillettes de chaque lot de sperme à analyser. Les amplifications doivent être effectuées en double pour chaque préparation d'ADN (6 amplifications au total) afin de s'assurer que l'ADN sera détecté, même dans les échantillons contenant une faible quantité de virus.
- iii) Un système de détection par PCR en temps réel et le logiciel d'analyse de données qui lui est associé sont nécessaires pour effectuer l'épreuve. Plusieurs systèmes de détection par PCR en temps réel sont disponibles. Dans le protocole décrit ci-dessous, c'est le système RotorGene 3000, Corbett Research Ltd, Australie qui a été utilisé, mais d'autres systèmes peuvent être utilisés. Les autres matériels nécessaires sont une micro-centrifugeuse, un thermo-cycleur, un bain-marie, un micro-vortex, un agitateur magnétique et des micro-pipettes. Les épreuves de PCR en temps réel sont capables de détecter de très petites quantités de l'acide nucléique cible, et les mesures appropriées pour éviter les contaminations doivent donc être appliquées¹.
- iv) L'épreuve de PCR en temps réel décrite ci-dessous comprend deux étapes. L'ADN du BoHV-1 est d'abord extrait du sperme en utilisant la résine Chelex-100 avec la protéinase K et le DL-dithiothréitol (DTT). La deuxième étape consiste en l'amplification et la détection par un système de PCR en temps réel de la matrice d'ADN extraite en utilisant pour la réaction le mélange Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG, Invitrogen Technologies (à noter que d'autres kits d'amplification pour PCR en temps réel sont disponibles dans le commerce, mais il importe que le kit et la plateforme PCR en temps réel retenue soient compatibles). Il existe de nombreuses sociétés commerciales en mesure de synthétiser les amorces et les sondes nécessaires. Dans ce protocole, les amorces et les sondes ont été synthétisées par Sigma-Genosys.

• Extraction de l'ADN

- i) Dans un tube à vis de 1,5 ml, ajouter :

Chelex 100 sodium (Sigma) (10 % p/v dans de l'eau distillée déionisée)	100 µl
Protéinase K (10 mg/ml, Sigma)	11.5 µl
DL-Dithiothréitol (1 M, Sigma)	7.5 µl
Eau exempte de nucléase	90 µl
Échantillon de sperme	10 µl

 Mélanger doucement avec une pipette².
- ii) Les tubes sont incubés à 56 °C pendant 30 min puis passés au vortex à grande vitesse pendant 10 s.
- iii) Les tubes sont alors incubés dans un bain-marie bouillant pendant 8 min et passés au vortex à grande vitesse pendant 10 s.
- iv) Les tubes sont centrifugés à 10 000 *g* pendant 3 min.
- v) Le surnageant³ est transféré dans un nouveau microtube ; il peut être utilisé immédiatement dans la PCR ou conservé à –20 °C pour être testé ultérieurement.

• Préparation des réactifs

Le mélange réactionnel pour la PCR en temps réel (Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG, ou tout autre mélange réactionnel) est habituellement fourni à une concentration double de la concentration d'utilisation. Il convient de suivre les instructions du producteur pour l'utilisation et la conservation.

Les solutions stock de travail pour les amorces et les sondes sont préparées avec de l'eau exempte de nucléase aux concentrations de 4,5 µM et 3 µM respectivement. Les solutions stocks pour les amorces et les sondes sont conservées à –20 °C et la solution pour les sondes devrait, en outre, être protégée de la lumière. Des fractions aliquotes pour une seule utilisation peuvent être préparées afin de réduire le nombre de cycles de congélation-décongélation et augmenter la durée de conservation des amorces et sondes.

1 Les contaminations peuvent provenir d'autres échantillons positifs ou, plus fréquemment de PCR précédentes. Les échantillons et les réactifs doivent être manipulés dans des locaux séparés avec des équipements différents pour la préparation des échantillons et des réactifs d'une part, et l'amplification/détection d'autre part.

2 Étant donné que le Chelex 100 sodium n'est pas soluble, il faut s'assurer qu'il est réparti de façon homogène dans la solution. Pour ce faire, il convient de placer le flacon sur un agitateur magnétique tout en pipettant.

3 Certains échantillons d'ADN peuvent apparaître laiteux et un voile blanc peut parfois se former lors des congélations-décongélation. Il semble que cela n'est aucune influence sur les résultats de la PCR. Aucun chauffage ni recentrifugation des échantillons sont nécessaires.

- **Protocole de la PCR en temps réel**

- i) Séquences des amorces et de la sonde

Le choix des amorces et de la sonde est développé dans Abril *et al.* (2004) et décrit ci-dessous.

Amorce de tête gB-F : 5'-TGT-GGA-CCT-AAA-CCT-CAC-GGT-3' (position 57499–57519 GenBank®, numéro d'accès AJ004801)

Amorce de queue gB-R : 5'-GTA-GTC-GAG-CAG-ACC-CGT-GTC-3' (position 57595–57575 GenBank®, numéro d'accès AJ004801)

Sonde TaqMan : 5'-FAM-AGG-ACC-GCG-AGT-TCT-TGC-CGC-TAMRA-3' (position 57525–57545 GenBank®, numéro d'accès AJ004801)

- ii) Préparation des mélanges réactionnel

Les mélanges réactionnels sont préparés dans une pièce propre du laboratoire. Tous les réactifs, à l'exception de l'échantillon à tester, sont mélangés avant répartition dans chaque tube de réaction. Dans chaque épreuve de PCR, des témoins appropriés doivent être inclus. Ces témoins doivent être au minimum composés d'un témoin de matrice (NTC, no template control, c.à.d. seulement les réactifs), de témoins négatifs (c.à.d. 1 pour 10 échantillons à tester) et de deux témoins positifs (forts et faibles). Chaque échantillon et chaque témoin sont analysés en double. Les amplifications sont réalisées sous un volume de 25 µl.

- a) Les mélanges réactionnels sont ajoutés dans une pièce propre (absence de culture de virus, les ADN extraits ou les produits après amplification devraient être manipulés dans cette pièce)

2 × Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG	12,5 µl
Colorant de référence ROX (optionnel)	0,5 µl
Amorce de tête (gB-F, 4,5 µM)	1 µl
Amorce de queue (gB-R, 4,5 µM)	1 µl
Sonde (3 µM)	1 µl
Eau (sans nucléase)	4 µl

- b) 5 µl de la matrice d'ADN sont ajoutés au mélange réactionnel pour un volume final de 25 µl. Les échantillons d'ADN sont préparés et ajoutés dans une pièce à part.

- iii) Réaction d'amplification en chaîne par polymérase en temps réel (TaqMan)

Les tubes de PCR sont placés dans un système de PCR en temps réel situé dans une pièce séparée et dédiée à la PCR.

Le système de détection PCR est programmé pour l'analyse de la façon suivante :

Paramètres de la PCR⁴

Un cycle : à 50 °C 2 min

Un cycle : à 95 °C 2 min⁵

45 cycles : à 95 °C 15 s
à 60 °C 45 s

- iv) Analyse des données de la PCR en temps réel

Le seuil est habituellement fixé selon les instructions des fabricants pour le logiciel utilisé. Une autre solution consiste à analyser complètement (c.à.d. jusqu'à 60 cycles d'amplification) les échantillons de sperme qui se sont révélés négatifs en isolement de virus et provenant d'animaux séronégatifs, afin de déterminer le bruit de fond associé au système de détection utilisé.

- **Interprétation des résultats**

- **Témoins**

Des témoins positif et négatif, ainsi que des témoins pour les réactifs doivent être inclus lors de l'épreuve PCR. Des échantillons de sperme, négatifs en isolement de virus et obtenus de taureaux séronégatifs,

4 Ces paramètres de la PCR sont basés sur les paramètres les plus adaptés au RotorGene 3000, Corbett Research Ltd, Australie, et peuvent varier d'une plateforme à l'autre.

5 Les systèmes de PCR avec la Taq polymérase provenant de fournisseurs différents peuvent nécessiter un délai de dénaturation (95 °C) plus long, allant jusqu'à 10 min. Il convient de suivre les instructions du fabricant.

peuvent être utilisés comme témoin négatif. Comme témoin positif, il est préférable d'utiliser des échantillons de sperme obtenus de taureaux naturellement infectés. Cependant, comme il peut être difficile de se les procurer, une autre solution est d'utiliser des témoins négatifs infectés avec une quantité connue de virus BoHV-1.

- **Résultats de l'épreuve**

Résultat positif : tout échantillon dont la valeur du cycle seuil (Ct) est égale ou inférieure à 45 est considéré positif. Le témoin positif doit avoir une valeur Ct dans une fourchette acceptable (± 3) précisée auparavant par des tests de répétabilité.

Résultat négatif : Tout échantillon qui ne présente pas de valeur Ct est considéré négatif. Le témoin négatif ne doit pas avoir de valeur Ct.

f) Différentiation des sous-types de l'herpèsvirus bovin 1 et des virus apparentés à l'herpèsvirus bovin 1

Il est possible de différencier les sous-types 1 et 2b du BoHV-1 par immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux, par radio-immuno-précipitation, par immunoperoxidase ou par immunoblot (31, 48). Grâce à une analyse par endonucléase de restriction HindIII, il est possible de faire la différence entre tous les sous-types reconnus du virus BoHV-1 (sous-types 1, 2a et 2b). Cette différenciation est basée sur le poids moléculaire de 3 fragments de l'ADN (I, K et L) (25). Cette analyse comprend une phase d'extraction de l'ADN à partir des virus ou des cellules infectées, une phase de digestion de l'ADN isolé par les endonucléases de restriction puis une phase de séparation des fragments obtenus par une électrophorèse en gel d'agarose. De telles techniques ont un intérêt diagnostique limité mais sont utiles pour les études épidémiologiques.

Quand il est nécessaire de faire la distinction entre les alphaherpèsvirus antigéniquement et génétiquement apparentés (BoHV-1, BoHV-5), l'herpèsvirus caprin (CpHV-1) et les herpèsvirus des cervidés (CvHV-1 et CvHV-2), il est possible de recourir à des méthodes améliorées utilisant des anticorps monoclonaux (17).

g) Interprétation des résultats

L'isolement de BoHV-1 ne signifie pas de manière non équivoque que le virus est l'agent causal de la maladie. Cela peut, par exemple, être un virus latent réactivé dans des conditions de stress. Un diagnostic de confirmation de laboratoire doit être fait sur les groupes d'animaux et doit être accompagné d'une séroconversion négative à positive, ou d'une élévation d'au moins 4 fois ou plus du titre d'anticorps anti-BoHV-1. Les animaux sur lesquels les échantillons nasaux ont été prélevés, doivent subir deux prises de sang à 2 ou 3 semaines d'intervalle. Ces échantillons de sérum couplés sont examinés tous les deux par épreuve sérologique détectant la présence d'anticorps spécifiques (voir section B.2).

2. Les épreuves sérologiques

Les épreuves sérologiques peuvent être utilisées à plusieurs fins :

- i) pour diagnostiquer une infection aiguë : des prélèvements de sérum pris sur un animal en phase aiguë et en convalescence sont examinés dans une seule épreuve. Une séroconversion de négatif en positif ou une augmentation d'au moins 4 fois du taux d'anticorps est considérée comme signe d'infection ;
- ii) pour démontrer l'absence d'infection, par exemple, dans le cadre des échanges internationaux ;
- iii) pour déterminer la prévalence de l'infection dans des études séro-épidémiologiques ;
- iv) pour participer à des programmes d'éradication et de surveillance ultérieure ;
- v) dans un but de recherche, par exemple, pour l'évaluation de la réponse en anticorps anti-BoHV1 après vaccination et épreuve virulente.

Des tests de SN (4) et divers tests ELISA (19) sont couramment utilisés pour détecter des anticorps sériques contre BoHV-1. Puisque la latence virale est une conséquence normale de l'infection par le BoHV-1, l'identification des animaux sérologiquement positifs fournit un indicateur du statut infectieux. Tout animal porteur d'anticorps contre le virus est considéré comme porteur latent et comme excréteur intermittent potentiel. Les seules exceptions sont les jeunes veaux qui ont acquis passivement ces anticorps par le colostrum de leur mère et les animaux non infectés qui ont été vaccinés à l'aide de vaccins inactivés.

Les tests sérologiques pour le BoHV-1 peuvent être classés généralement en deux catégories : les tests conventionnels et les tests pour marqueurs. Le seul test sérologique pour marqueur disponible actuellement est

l'ELISA de blocage gE de BoHV-1 (40). Les tests sérologiques conventionnels sont la SN, l'ELISA de blocage du BoHV-1 ainsi que des ELISA indirects.

Des tests ELISA, incluant l'ELISA gE, sont souvent utilisés pour la détection d'anticorps dans des échantillons de lait, mais ont quelques limitations. Un résultat positif de l'ELISA gE sur des laits de tank indique que l'infection circule déjà dans un troupeau (13). Avec l'ELISA de blocage gB, un résultat positif est obtenu quand plus de 10 % à 15 % du troupeau est infecté (46). En conséquence, il est impossible de déclarer un troupeau indemne de BoHV1 sur la base de tests réalisés sur le lait de tank ou sur un pool de lait, et un test négatif sur le lait de tank doit être suivi par l'intermédiaire d'échantillons de sérum de tous les animaux du troupeau. Pour des programmes de surveillance, des tests réalisés sur le lait de tank peuvent donner une estimation de la prévalence de BoHV-1 dans le troupeau, une région ou un pays (27). Ces tests doivent être complétés par des tests sérologiques (individuels ou sur groupes d'animaux) sur les animaux ne donnant pas de lait.

Lors d'une récente étude, les épreuves pour la détection des anticorps utilisées en routine par les laboratoires nationaux de référence en Europe ont été évaluées (18). Les laboratoires de référence de 12 pays européens ont participé à cette étude. Cinquante trois sérums et 13 échantillons de lait en provenance de plusieurs pays ont été envoyés en double, sous un numéro de code, aux laboratoires participants. Les sérums comprenaient 3 sérums de référence européens, à savoir EU1 (positif), EU2 (faiblement positif et considéré comme l'échantillon seuil) et EU3 (négatif) (30). L'étude a conclu que la SN et l'ELISA gB étaient les épreuves les plus sensibles pour la détection des anticorps dans les sérums. En revanche, pour la détection des anticorps dans les échantillons de lait, c'est l'ELISA indirect qui était l'épreuve la plus sensible. De plus, les ELISAs du commerce se sont révélés plus performants que les ELISAs préparés dans les laboratoires.

Récemment, de nouveaux ELISAs indirect ont été mis au point qui sont très sensibles et spécifiques. Les résultats de ces ELISA sont équivalents à ceux obtenus par l'ELISA de blocage gB et la SN (3).

a) Séroneutralisation virale (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Les protocoles utilisés pour les épreuves de SN sont variables. Les variations concernent la souche virale utilisée dans le protocole, la première dilution du sérum, la période d'incubation virus/sérum (1 à 24 h), du type de cellules utilisées, du jour de lecture finale et de la lecture du point final (50 % ou 100 %) (29). De toutes ces variables, la période d'incubation du virus/sérum a l'effet le plus important sur le titre d'anticorps. Avec une période d'incubation de 24 h, on peut atteindre des taux en anticorps 16 fois plus élevés qu'avec une période d'incubation de 1 h (4), et cela est recommandé dans les cas où une sensibilité maximale est exigée (par exemple pour les échanges internationaux). Diverses cellules ou lignées cellulaires bovines sont utilisables pour l'utilisation d'épreuves de SN, y compris les cellules bovines secondaires rénales et testiculaires, les lignées cellulaires bovines pulmonaires et trachéales, ou une lignée cellulaire bovine rénale continue Madin-Darby.

Un protocole approprié pour une épreuve de SN est mentionné ci-dessous :

- i) inactiver les sérums, y compris les sérums de référence témoins, pendant 30 min au bain-marie à 56 °C ;
- ii) faire des dilutions doubles des sérums à tester dans le milieu de culture cellulaire. Commencer par le sérum non dilué et continuer jusqu'à 1/1024 horizontalement dans une plaque microtitre 96 puits à fond plat, avec au moins 2 puits par dilution et des volumes de 50 µl par puits. Les dilutions d'un sérum témoin positif, et des sérums internes témoins positif et négatif sont également utilisés dans l'épreuve. Un puits supplémentaire avec du sérum test non dilué est également utilisé pour le contrôle de la toxicité des sérums ;
- iii) ajouter 50 µl par puits de BoHV-1 à une dilution en milieu de culture calculée pour avoir 100 à 200 DICT₅₀ par puits. Dans les puits témoins négatifs, ajouter 50 µl de milieu de culture à la place des virus. Ajouter 100 µl de milieu de culture dans 10 puits vides pour évaluer la croissance cellulaire ;
- iv) faire au moins 4 dilutions de 10 en 10 du stock viral résiduel (titrage de retour) dans le milieu de culture, en utilisant 50 µl par puits et au moins 4 puits par dilution ;
- v) incuber les plaques pendant 24 h à 37 °C ;
- vi) ajouter 100 µl par puits de la suspension cellulaire à raison de 3×10^4 cellules par puits ;
- vii) incuber la plaque pendant 3 à 5 jours à 37 °C ;

- viii) lire les plaques au microscope pour y détecter des ECP. Valider l'épreuve en testant par titrage viral de retour les puits testés (qui devrait donner une valeur de 100 DICT₅₀ avec une gamme de valeurs permises entre 30 et 300 DICT₅₀), les sérums témoins et les puits de contrôle cellulaire. Le sérum témoin positif devrait donner un titre de \pm une dilution 2 fois (\pm 0,3 log₁₀ unités) de sa valeur cible. Le sérum faiblement positif devrait être positif. Le sérum négatif ne devrait donner aucune neutralisation une fois examiné sans dilution (équivalent à la dilution finale 1/2 au stade de neutralisation). Dans les puits de contrôle cellulaire, la couche monocellulaire doit être intacte ;
- ix) les résultats des épreuves sérologiques sont exprimés en tant que dilution de sérum réciproque qui a neutralisé le virus de 50 % des puits. Si le virus est neutralisé dans 50 % des puits avec le sérum non dilué, le titre (à la dilution initiale) est lu comme 1 (1/2 si on utilise la dilution finale comme référence). Si le virus est neutralisé dans tous les puits de sérum non dilué et dans 50 % des puits avec sérum à moitié dilué, le titre (dilution initiale) est 2 (dilution finale 1/4). Pour des résultats qualitatifs, n'importe quelle neutralisation à un titre de 1 ou supérieur (dilution initiale conventionnelle) est considérée comme positive. Si on observe une cytotoxicité dans les puits du contrôle de la toxicité sérique, l'échantillon est dit toxique (pas de résultat) à moins que la neutralisation virale sans cytotoxicité ne soit observée à de plus hautes dilutions et à un titre pouvant être lu sans ambiguïté. Dans le cas où le sérum est cytotoxique, sérum pour lequel il est donc difficile d'obtenir un résultat, le fait de changer le milieu des puits dans les dilutions les plus basses (2 ou 3 dilutions) 16 à 24 h après l'addition de cellules va empêcher l'effet cytotoxique de beaucoup de sérums qui posent problème.

b) Méthode immuno-enzymatique (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Il semble que les tests de SN utilisés pour la détection des anticorps anti-BoHV-1 soient progressivement remplacés par des tests ELISA. Une procédure normalisée pour l'ELISA n'a pas été établie. De nombreux types d'ELISA sont disponibles dans le commerce, dont certains sont également utilisables pour détecter les anticorps dans le lait (18). Pour des raisons de normalisation (d'étalonnage) dans un pays ou un État, il peut être souhaitable de comparer la qualité des kits de diagnostic et, avant leurs utilisations par les laboratoires du pays, de réaliser des contrôles par lots à la sortie de la chaîne de production par le laboratoire national de référence en suivant les critères précédemment définis.

Les protocoles ELISA présentent un certain nombre de variations. Les plus communes sont : la préparation et le recouvrement des antigènes, la dilution de l'échantillon test, la période d'incubation de l'antigène et de l'échantillon, et la solution substrat/chromogène. Avant d'être utilisé en routine, un ELISA doit être validé en ce qui concerne sa sensibilité, sa spécificité et sa reproductibilité (voir Chapitre 1.1.4.). À cette fin, un panel de sérums diagnostiques : des sérums très positifs, faiblement positifs et négatifs, devront être testés (par exemple par un test de SN).

• Épreuve immuno-enzymatique indirecte

Un test ELISA indirect est basé sur la liaison des anticorps spécifiques dirigés contre BoHV-1 présents dans un échantillon avec de l'antigène de BoHV-1 fixé. Les anticorps liés et fixés sont détectés grâce à de l'antisérum anti-immunoglobuline bovine marqué avec une enzyme. La présence des anticorps dans l'échantillon entraînera l'apparition d'une coloration après addition de la solution substrat/chromogène.

• Épreuve immuno-enzymatique de blocage

Le principe de l'ELISA de blocage ou ELISA de compétition est basé sur le blocage de la liaison de l'antigène à l'antisérum BoHV-1, antisérum qui est couplé à l'enzyme ou à des anticorps monoclonaux anti-BoHV-1 marqué par les anticorps de l'échantillon à tester. La présence des anticorps dans l'échantillon à tester bloquera la liaison, il en résultera une diminution de la coloration après l'addition de la solution substrat/chromogène. Un exemple d'ELISA gB de blocage est donné ci-dessous :

- i) préparer l'antigène par multiplication du BoHV-1 en culture cellulaire. Quand des ECP étendus sont observés, les cellules et le milieu sont congelés à -20°C . Après décongélation, le lysat cellulaire est centrifugé pendant 4 h à 8 500 *g*. Le culot contenant le virus est suspendu dans un petit volume de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), refroidi sur glace et agité à l'aide d'un sonicateur. La préparation antigénique est alors centrifugée pendant 10 min à 800 *g*, et inactivée si nécessaire par addition de détergent (Nonidet P 40 à la concentration finale de 0,5 %). La préparation antigénique est utilisée à une dilution appropriée pour couvrir les plaques. Beaucoup d'autres méthodes de productions d'antigène peuvent être trouvées dans la littérature ;
- ii) sensibiliser la plaque de microtitrage avec l'antigène en ajoutant 100 μl d'antigène dilué (dans 0,05 M de tampon carbonate, pH 9,6) dans chaque puits de la microplaque. Fermer les boîtes avec du ruban adhésif, incubé à 37°C pendant une nuit, et stocker à -20°C ;
- iii) avant que le test soit réalisé, laver les plaques avec 0,05 % de Tween 80. Ajouter 100 μl de sérum négatif (sérum de veau fœtal, SVF), 100 μl de chacun des sérums à tester et 100 μl des sérums

témoins positif, faiblement positif et négatif. Habituellement, les échantillons de sérum sont testés non dilués. Secouer, recouvrir la plaque et incubé une nuit à 37 °C. Pour certains ELISA, il est nécessaire de chauffer les sérums à 56 °C pendant 30 min avant de les tester afin d'éviter les réactions faibles non spécifiques ;

- iv) laver les plaques entièrement, et ajouter 100 µl de conjugué anticorps monoclonal anti-gB de BoHV-1/peroxydase de raifort à une dilution prédéterminée, et incubé encore pendant 1 h à 37 °C. L'anticorps monoclonal doit être choisi soigneusement pour sa spécificité vis-à-vis de la gB de BoHV-1 ;
- v) laver les plaques et ajouter une solution fraîchement préparée substrat/chromogène (par exemple : 0,05 M d'un tampon citrate, pH 4,5, contenant de l'acide 2,2'-azino-bis-[3-éthylbenzothiazoline]-6-sulphonique [ABTS ; 0,55 mg/ml] et une solution 3 % d'H₂O₂ fraîchement ajoutée [5 µl/ml]), et incubé pendant le temps approprié (1 à 2 h à température ambiante) ;
- vi) mesurer l'absorbance des puits de dilution par un spectrophotomètre microplaque à 405 nm ;
- vii) Calculer pour chaque échantillon le pourcentage de blocage $[(OD_{FCS} - OD_{éch. \text{ à tester}})/OD_{FCS} \times 100\%]$
- viii) un échantillon test est considéré comme positif si son pourcentage de blocage est égal ou supérieur à 50 %. Le test est valide si les témoins sérums positifs ou faiblement positifs sont positifs et si le témoin sérum négatif est négatif. Les limites acceptables pour les valeurs du seuil et les témoins doivent être déterminées par des expériences individuelles.

c) Normalisation

Dans chaque test sérologique, des témoins appropriés à l'aide de sérums très positifs, faiblement positifs et négatifs doivent être inclus. Un groupe de scientifiques en Europe, initié par un groupe de vétérinaire responsables de l'insémination artificielle dans l'Union Européenne (UE), a donné son accord sur l'utilisation de sérums fortement positifs (EU1), faiblement positifs (EU2) et négatifs (EU3) pour la normalisation des tests de BoHV-1 dans les laboratoires qui examinent en routine les échantillons des centres d'insémination (30). Ces sérums ont été adoptés comme réactif de référence international de l'OIE pour les tests BoHV-1 et sont disponibles en quantités limitées dans les Laboratoires de référence de l'OIE pour l'IBR/IPV⁶. Les épreuves recommandées pour les échanges internationaux (SN ou ELISA) doivent être capables de caractériser comme positifs à la fois les sérums de référence fortement et faiblement positifs (ou sérums de référence secondaires nationaux d'activité équivalente). En raison d'une quantité limitée de sérums de référence internationaux, il convient de préparer une nouvelle série de sérums de référence lyophilisés (et de lait) à partir d'animaux infectés et vaccinés. Cette série devrait être utilisée pour la validation de tests nouveaux et l'harmonisation des tests entre laboratoires.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

De nombreux vaccins BoHV-1 atténués et inactivés sont disponibles actuellement. Les vaccins contiennent les souches virales qui ont habituellement subi de multiples passages en culture de cellules. Certaines lignées de virus vaccinaux ont un phénotype thermosensible, par exemple ils ne peuvent pas se répliquer à des températures supérieures ou égales à 39 °C. Les vaccins atténués sont administrés de manière intranasale ou intramusculaire. Les vaccins inactivés contiennent une concentration élevée de virus inactivés ou des portions de particules virales complétées avec un adjuvant pour stimuler une réponse immunitaire adéquate. Les vaccins inactivés sont administrés par voie intramusculaire ou sous-cutanée.

Des vaccins marqués ou DIVA (différentiation entre animaux infectés et vaccinés) sont maintenant disponibles dans de nombreux pays. Ces vaccins marqués inactivés ou atténués sont basés sur des mutants délétés ou sur des sous-unités de virion, par exemple la glycoprotéine gD. L'utilisation de tels vaccins marqués en relation avec des épreuves diagnostiques associées rend possible la distinction entre les animaux vaccinés et les animaux infectés, et peuvent donc fournir une base à de nouveaux programmes d'éradication de BoHV-1. Les programmes de vaccination intensive peuvent réduire la prévalence d'animaux infectés (5, 22), programmes qui peuvent être suivis en employant une épreuve de diagnostic associée. Dans les situations où c'est économiquement justifiable, les animaux infectés de manière latente pourraient être éliminés, si nécessaire. Il en résulterait que la région serait alors indemne de BoHV-1. Quelques pays ont mis en place des programmes d'éradication et de contrôle au début des années 1980. Différentes politiques ont été appliquées en fonction de la prévalence des troupeaux infectés, des pratiques d'élevage et des stratégies d'éradication. À l'heure actuelle,

6 Disponible auprès de l'Institut central pour le contrôle des pathologies animales, Division de virologie, P.O. Box 2004, 8203 AA Lelystad, Pays-Bas, et AFSSA Lyon, Laboratoire de pathologie bovine, 31 avenue Tony Garnier, BP 7033, 69342 Lyon Cedex 07, France.

dans l'Union européenne, seuls les vaccins DIVA (dont la gE a été déléetée), vivants ou inactivés, sont commercialisés et utilisés dans les programmes de contrôle et d'éradication.

Les 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 générales et peuvent être complétées par des directives nationales ou régionales.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Le vaccin est préparé en utilisant un système de caractérisation. L'origine, l'historique des passages en culture de cellules et les conditions de conservation du lot de semence primaire du virus doivent être enregistrés. Un test d'identification virale peut être utilisé sur ce lot de semence primaire. Le lot de semence contient des souches BoHV-1 qui ont été atténuées pour donner la souche vaccinale vivante. Les souches peuvent être atténuées par passage multiple en cultures de cellules, en adaptant le virus à croître à basse température (mutants thermosensibles), ou par génie génétique, par exemple, en déléétant un ou plusieurs gènes viraux (par ex., le gène de la glycoprotéine E du BoHV-1) qui ne sont pas essentiels à la réplication. Il devrait y avoir moyen de distinguer les virus vaccinaux vivants des autres virus (par exemple par leur courbes de croissance en fonction de la température ou par le polymorphisme de longueur des fragments de restriction). Les souches utilisées pour la préparation de vaccins inactivés ne doivent pas être atténuées. Le lot de semence doit donc être exempt de contaminants.

b) Méthode de culture

Les cellules utilisées pour la production de vaccin sont préparées en utilisant un système de semence. Le virus devrait être cultivé sur des lignées cellulaires établies dont on a montré qu'elles sont aptes à la production vaccinale, par exemple la lignée de cellules rénales bovine Madin-Darby. L'historique de la lignée cellulaire doit être connu. Les lignées cellulaires doivent être exemptes d'agents externes et peuvent être testées pour leur capacité à générer des tumeurs.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Indépendamment de la méthode de préparation du virus vaccinal de semence, le virus de semence utilisé dans l'incorporation d'un vaccin vivant devra montrer son efficacité, son innocuité et sa pureté.

i) Efficacité

Celle-ci est démontrée par une épreuve de vaccination en condition de laboratoire. Un exemple de lignes directrices est donné dans une monographie de la Pharmacopée Européenne (12). Brièvement, le vaccin est administré à 5 veaux de 2 à 3 mois séronégatifs envers le BoHV-1. Deux veaux sont gardés comme témoins. Tous les veaux sont infectés par voie intranasale 3 semaines plus tard avec une souche de BoHV-1 virulente qui induit des signes typiques d'infection à BoHV-1. Les veaux vaccinés ne devraient montrer aucun signe clinique ou des signes cliniques faibles. Le titre viral maximal retrouvé dans le mucus des veaux vaccinés puis infectés devrait être 100 fois moindre que celui trouvé dans les veaux témoins. La période d'excrétion virale devrait être plus courte d'au moins 3 jours chez les veaux vaccinés que chez les veaux témoins.

ii) Innocuité

Une quantité de virus équivalente à 10 doses de vaccin (a) ne doit pas induire de réaction locale ou généralisée significative chez les jeunes veaux ; (b) ne doit pas causer d'infection fœtale ou d'avortement, et (c) ne doit pas redevenir virulente après 5 passages successifs sur veaux. Pour un vaccin inactivé une double dose est généralement administrée. Le test de réversion vers la virulence n'est pas applicable pour les vaccins inactivés.

iii) Pureté

Le lot de semence est testé pour l'absence de virus étranger et l'absence de contamination bactérienne, fongique et mycoplasmaïque. Les virus étrangers qui suivent doivent être particulièrement exclus des vaccins BoHV-1 : les adénovirus, le virus Akabane, le coronavirus bovin, les herpèsvirus bovins 2, 4 et 5, le parvovirus bovin, le virus respiratoire syncytial bovin, le rotavirus bovin, le virus de la vaccine et les virus de la maladie d'Aujeszky, de la fièvre catarrhale ovine, de la fièvre des 3 jours, de la leucose bovine, de la papillomatose bovine, de la stomatite papuleuse bovine, de la diarrhée virale bovine, du cowpox, de la fièvre aphteuse, de la dermatose nodulaire cutanée, du coryza gangreneux, du para-influenza 3, de la rage, de la peste bovine et de la stomatite vésiculeuse. Comme le virus de la diarrhée virale bovine (aussi bien le virus cytopathogène que non-cytopathogène) a été souvent isolé comme contaminant de vaccins, une attention spéciale doit lui être accordée pour s'assurer de son absence.

2. Méthode de fabrication

Toutes les substances utilisées pour la production de vaccins doivent être exemptes de contaminants. On devrait employer des cellules qui n'ont pas plus de 20 passages à partir de la culture cellulaire de base. Le virus de semence ne devrait pas être issu de plus de 5 passages à partir du lot de semence primaire. Les virus vaccinaux issus du génie génétique sont traités de la même façon que les souches virales vaccinales atténuées conventionnelles. Quand suffisamment de cellules se sont développées, l'infection de la lignée cellulaire avec le virus vaccinal peut avoir lieu. L'addition d'antibiotiques est normalement réservée aux liquides de culture cellulaire. Le liquide surnageant est récolté au moment où la production virale atteint son maximum. Pour les vaccins vivants, le surnageant est clarifié, mélangé à un stabilisateur, congelé-déshydraté et embouteillé. Pour la production de vaccins inactivés classiques, le surnageant est homogénéisé avant que l'agent inactivateur ne soit ajouté. Après cette procédure, un essai pour évaluer l'inactivation complète du virus est effectué. Le test consiste en deux passages en culture cellulaire. La suspension virale inactivée est alors mélangée avec un adjuvant et mis en bouteille. La production des vaccins doit être conforme aux directives de bonne pratique en matière de production (GMP pour *Good Manufacturing Practice*).

3. Contrôles en cours de fabrication

La lignée de culture cellulaire utilisée ainsi que la lignée virale doivent être dépourvues de tout contaminant. Les cellules doivent avoir une morphologie normale avant d'être inoculée par le virus. Elles sont observées afin d'y distinguer des ECP pendant leur culture. Les cellules témoins non inoculées doivent avoir maintenu leur morphologie jusqu'à la période de récolte. Un titrage viral est réalisé sur le surnageant récolté. Pendant la production de vaccins inactivés, des essais sont réalisés pour assurer l'inactivation. Le volume final devrait être examiné pour l'absence de contaminants.

4. Contrôles des lots

Les tests suivants doivent être normalement réalisés sur chaque lot. Des exemples de lignes directrices pour réaliser les contrôles des lots peuvent être trouvés dans les Directives européennes, la Pharmacopée européenne et le code des règlements fédéraux du département de l'agriculture des États-Unis d'Amérique.

a) Stérilité

Aucune bactérie, aucun champignon et virus extrinsèques ne doivent être présents. Les tests de stérilité et d'absence de contamination du matériel biologique peuvent être trouvés au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Pour les vaccins inactivés, une double dose de vaccin, et pour les vaccins atténués, 10 fois la dose, ne doivent pas induire d'effets nuisibles sur des jeunes veaux séronégatifs.

c) Activité

Tester un lot représentatif suffit pour contrôler l'activité, comme cela est décrit dans la section C.1.c.i. Dans le cas de vaccins atténués, le titre viral de chaque lot doit être déterminé et ne doit pas dépasser 1/10 de la dose à laquelle le vaccin a démontré son innocuité et ne doit pas être inférieur au titre minimum requis. Dans le cas de vaccins inactivés, la puissance est testée en utilisant d'autres méthodes validées, par exemple, des expériences réussies sur des veaux.

d) Durée d'immunité

Pour ce faire, on peut se contenter de tester le virus de semence qui est multiplié et qui est à l'origine des virus vaccinaux. Un vaccin efficace contre le BoHV-1 doit induire une immunité protectrice d'au moins 1 an, cependant beaucoup de vaccins existants n'ont pas été testés selon cette norme.

e) Stabilité

Pour les vaccins vivants, le titre viral doit rester constant jusqu'à 3 mois au moins après la date de conservation indiquée. En outre, des tests de détermination de la teneur en humidité, de la concentration en conservateur et de pH sont réalisés. Pour des vaccins inactivés, la viscosité et la stabilité de l'émulsion sont aussi testées.

f) Agents de conservation

L'efficacité des agents de conservation doit être démontrée. La concentration de l'agent et sa persistance durant toute la durée de conservation doivent être vérifiées. La concentration doit être conforme à l'établissement de limites pour les agents de conservation.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Aucune précaution particulière ne doit être prise. Le BoHV-1 n'est pas pathogène pour l'homme.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Chaque produit doit être inoffensif chez au moins 2 veaux sensibles qui reçoivent une double dose (dans le cas des vaccins inactivés) ou 10 fois la dose (dans le cas des vaccins vivants).

b) Activité

Voir section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABRIL C., ENGELS M., LIMAN A., HILBE M., ALBINI S., FRANCHINI M., SUTER M. & ACKERMANN M. (2004). Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. *J. Virol.*, **78**, 3644–3653.
2. ASHBAUGH S.E., THOMPSON K.E., BELKNAP E.B., SCHULTHEISS P.C., CHOWDHURY S. & COLLINS J.K. (1997). Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 387–394.
3. BEER M., KÖNIG P., SCHIELKE G. & TRAPP S. (2003). Markerdiagnostik in der Bekämpfung des Bovinen Herpesvirus vom Typ 1: Möglichkeiten und Grenzen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, **116**, 183–191.
4. BITSCH V. (1978). The P37/24 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus serum neutralization test. *Acta Vet. Scand.*, **19**, 497–505.
5. BOSCH J.C., DE JONG M.C.M., FRANKEN P., FRANKENA K., HAGE J.J., KAASHOEK M.J., MARIS-VELDHUIS M.A., NOORDHUIZEN J.P.T.M., VAN DER POEL W.H.M., VERHOEFF J., WEERDMEESTER K., ZIMMER G.M. & VAN OIRSCHOT J.T. (1998). An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. *Vaccine*, **16**, 265–271.
6. BRUNNER D., ENGELS M., SCHWYZER M. & WYLER R. (1988). A comparison of three techniques for detecting bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in naturally and experimentally contaminated bovine semen. *Zuchthygiene (Berlin)*, **23**, 1–9.
7. COLLINS J.K., AYERS V.K. & CARMAN J. (1988). Evaluation of an antigen-capture ELISA for the detection of bovine herpesvirus type 1 shedding from feedlot cattle. *Vet. Microbiol.*, **16**, 101–107.
8. DEKA D., MAITI RAMNEEK N.K. & OBEROI M.S. (2005). Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 1085–1094.
9. EDWARDS S., CHASEY D. & WHITE H. (1983). Experimental infectious bovine rhinotracheitis: comparison of four antigen detection methods. *Res. Vet. Sci.*, **34**, 42–45.
10. EDWARDS S. & GITAO G.C. (1987). Highly sensitive antigen detection procedures for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis: amplified ELISA and reverse passive haemagglutination. *Vet. Microbiol.*, **13**, 135–141.
11. EDWARDS S., WHITE H. & NIXON P. (1990). A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 isolated in the U.K. *Vet. Microbiol.*, **22**, 213–223.

12. EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 3RD EDITION (1997). Monograph 0696: Live freeze dried vaccine for infectious bovine rhinotracheitis. Council of Europe, Strasbourg, France.
13. FRANKENA K., FRANKEN P., VANDEHOEK J., KOSKAMP G. & KRAMPS J.A. (1997). Probability of detecting antibodies to bovine herpesvirus 1 in bulk milk after the introduction of a positive animal on to a negative farm. *Vet. Rec.*, **140**, 90–92.
14. FUCHS M., HUBERT P., DETTERER J. & RZIHA H.-J. (1999). Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 2498–2507.
15. GROM J., HOSTNIK P., TOPLAK I. & BARLIC-MAGANJA D. (2006). Molecular detection of BHV-1 in artificially inoculated semen and in the semen of a latently infected bull treated with dexamethasone. *Vet. J.*, **171**, 539–544.
16. KAASHOEK M.J., MOERMAN A., MADIC J., RIJSEWIJK F.A.M., QUAK J., GIELKENS A.L.J. & 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.
17. KEUSER V., SCHYNTS F., DETRY B., COLLARD A., ROBERT B., VANDERPLASSCHEN A., PASTORET P.-P. & THIRY E. (2004). Improved antigenic methods for differential diagnosis of bovine, caprine, and cervine alphaherpesviruses related to bovineherpesvirus 1. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1228–1235.
18. KRAMPS J.A., BANKS M., BEER M., KERKHOFS P., PERRIN M., WELLENBERG G.J. & VAN OIRSCHOT J.T. (2004). Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. *Vet Microbiol.*, **102**, 169–181.
19. KRAMPS J.A., QUAK S., WEERDMEESTER K & VAN OIRSCHOT J.T. (1993). Comparative study on sixteen enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. *Vet. Microbiol.*, **35**, 11–21.
20. LOVATO L., INMAN M., HENDERSON G., DOSTER A. & JONES C. (2003). Infection of cattle with a bovine Herpesvirus 1 strain that contains a mutation in the latencyrelated gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *J. Virol.*, **77**, 4848–4857.
21. MAGYAR G., TANYI J., HORNYAK A. & BATHA A. (1993). Restriction endonuclease analysis of Hungarian bovine herpesvirus isolates from different clinical forms of IBR, IPV and encephalitis. *Acta Vet. Hung.*, **41**, 159–170.
22. MARS M.H., DE JONG M.C.M., FRANKEN P. & VAN OIRSCHOT J.T. (2001). Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. *Vaccine*, **19**, 1924–1930.
23. MASRI S.A., OLSON W., NGUYEN P.T., PRINS S. & DEREGT D. (1996). Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. *Can. J. Vet. Res.*, **60**, 100–107.
24. MECHOR G.D., ROUSSEAU C.G., RADOSTITS O.M., BABIUK L.A. & PETRIE L. (1987). Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Can. J. Vet. Res.*, **51**, 452–459.
25. METZLER A.E., MATILE H., GASSMANN U., ENGELS M. & WYLER R. (1985). European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch. Virol.*, **85**, 57–69.
26. MOORE S., GUNN M. & WALLS D. (2000). A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Vet. Microbiol.*, **75**, 145–153.
27. NYLIN B., STROGER U. & RONSHOLT L. (2000). A retrospective evaluation of a bovine herpesvirus-1 (BHV-1) antibody ELISA on bulk-tank milk samples for classification of the BHV-1 status of Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, **47**, 91–105.
28. PARSONSON I.M. & SNOWDON W.A. (1975). The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus. *Aust. Vet. J.*, **51**, 365–369.

29. PERRIN B., BITSCH V., CORDIOLI P., EDWARDS S., ELOIT M., GUERIN B., LENIHAN P., PERRIN M., RONSHOLT L., VAN OIRSCHOT J.T., VANOPDENBOSCH E., WELLEMANS G., WIZIGMANN G. & THIBIER M. (1993). A European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12**, 969–984.
30. PERRIN B., CALVO T., CORDIOLI P., COUDERT M., EDWARDS S., ELOIT M., GUERIN B., KRAMPS J.A., LENIHAN P., PASCHALERI E., PERRIN M., SCHON J., VAN OIRSCHOT J.T., VANOPDENBOSCH E., WELLEMANS G., WIZIGMANN G. & THIBIER M. (1994). Selection of European Union standard reference sera for use in the serological diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **13**, 947–960.
31. RIJSEWIJK F.A., KAASHOEK M.J., LANGEVELD J.P., MELOEN R., JUDEK J., BIENKOWSKA-SZEWCZYK K., MARIS-VELDHUIS M.A. & VAN OIRSCHOT J.T. (1999). Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *J. Gen. Virol.*, **80**, 1477–1483.
32. ROLA J., POLAK M. & ZMUDZINSKI J. (2003). Amplification of DNA of BHV 1 isolated from semen of naturally infected bulls. *Bull. Vet. Inst. Pulaway*, **47**, 71–75.
33. ROS C., RIQUELME M.E., OHMAN FORSLUND K. & BELAK S. (1999). Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genome sequences. *J. Virol. Methods*, **83**, 55–65.
34. SANTURDE G., SILVA N.D., VILLARES R., TABARES E., SOLANA A., BAUTISTA J.M., CASTRO J.M. & DA SILVA N. (1996). Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Vet. Microbiol.*, **49**, 81–92.
35. SCHYNTS F., BARANOWSKI E., LEMAIRE M. & THIRY E. (1999). A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains. *Vet. Microbiol.*, **66**, 187–195.
36. SMITS C.B., VAN MAANEN C., GLAS R.D., DE GEE A.L., DIJKSTRAB T., VAN OIRSCHOT J.T. & RIJSEWIJK F.A. (2000). Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *J. Virol. Methods*, **85**, 65–73.
37. TERPSTRA C. (1979). Diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis by direct immunofluorescence. *Vet. Q.*, **1**, 138–144.
38. VAN ENGELBURG F.A., MAES R.K., VAN OIRSCHOT J.T. & RIJSEWIJK F.A. (1993). Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 3129–3135.
39. VAN ENGELBURG F.A.C., VAN SCHIE F.W., RIJSEWIJK F.A.M. & VAN OIRSCHOT J.T. (1995). Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 308–312.
40. VAN OIRSCHOT J.T., KAASHOEK M.J., MARIS-VELDHUIS M.A., WEERDMEESTER K. & RIJSEWIJK F.A.M. (1997). An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. *J. Virol. Methods*, **67**, 23–34.
41. VAN OIRSCHOT J.T., STRAVER P.J., VAN LIESHOUT J.A.H., QUAK J., WESTENBRINK F. & VAN EXSEL A.C.A. (1993). A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet. Rec.*, **132**, 32–35.
42. VILCEK S., NETTLETON P.F., HERRING J.A. & HERRING A.J. (1994). Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, **42**, 53–64.
43. WAGTER L.H.A., GLAS R.D., BLEUMINK PLUYM N., VAN ENGELBURG F.A.C., RIJSEWIJK F.A.M. & HOUWERS D.J. (1996). A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of bovine herpesvirus 1 (BHV1) in selectively digested whole bovine semen. *Vet. Res. Comm.*, **20**, 401–408.
44. WEIBLEN R., KREUTZ L., CANABOROO T.F., SCHUCH L.C. & REBELATTO M.C. (1992). Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. *J. Vet. Diag. Invest.*, **4**, 341–343.

45. WELLENBERG G.J., VERSTRATEN E.R.A.M., MARS M.H. & VAN OIRSCHOT J.T. (1998). Detection of bovine herpesvirus 1 glycoprotein E antibodies in individual milk samples by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 409–413.
46. WELLENBERG G.J., VERSTRATEN E.R.A.M., MARS M.H. & VAN OIRSCHOT J.T. (1998). ELISA detection of antibodies to glycoprotein E of bovine herpesvirus 1 in bulk milk samples. *Vet Rec.*, **142**, 219–220.
47. WIEDMANN M., BRANDON R., WAGNER P., DUBOVI E.J. & BATT C.A. (1993). Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *J. Virol. Methods*, **44**, 129–140.
48. WYLER R., ENGELS M. & SCHWYZER M. (1989). Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV1). *In: Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs*, Wittmann G., ed. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA, 1–72.
49. XIA J.Q., YASON C.V. & KIBENGE F.S. (1995). Comparison of dot blot hybridization, polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. *Can. J. Vet. Res.*, **59**, 102–109.
50. YASON C.V., HARRIS L.M., MCKENNA P.K., WADOWSKA, D. & KIBENAGE F.S.B. (1995). Establishment of conditions for the detection of bovine herpesvirus-1 by polymerase chain reaction using primers in the thymidine kinase region. *Can. J. Vet. Res.*, **59**, 94–101.

*

* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la Rhinotrachéite infectieuse bovine/Vulvovaginite infectieuse pustuleuse (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).

DERMATOSE NODULAIRE CONTAGIEUSE

RÉSUMÉ

La dermatose nodulaire contagieuse (DNC) est une maladie virale du bétail due à un poxvirus et caractérisée par de la fièvre, l'apparition de volumineux nodules sur la peau, les muqueuses et les organes internes, de l'anémie, une hypertrophie des noeuds lymphatiques et de l'œdème cutané, spécialement dans les parties déclives. Elle peut entraîner la mort. Son importance économique est due aux pertes de production qu'elle occasionne, en particulier dans les troupeaux laitiers. Elle cause également des dommages importants aux cuirs. La DNC est causée par diverses souches de Capripoxvirus indistinctes au plan antigénique des souches responsables de la variole ovine et de la variole caprine. Cependant, la distribution géographique des deux affections est différente, ce qui suggère que les souches bovines de Capripoxvirus ne peuvent infecter ni se transmettre au mouton ou à la chèvre. La transmission du virus s'effectue essentiellement par des insectes, la contamination par contact direct en l'absence d'insectes n'ayant pas été observée. Jusqu'à 1988, la DNC était confinée aux régions sub-sahariennes ainsi qu'à l'Égypte. Toutefois, deux foyers de cette maladie, confirmés par le laboratoire, ont été observés : l'un, en Israël en 1989, où il a été éliminé par abattage de tous les animaux infectés, malades et contaminés, et par des mesures de vaccination et l'autre à la Réunion en 1993. Un foyer a été rapporté également à Bahreïn la même année, mais il n'a pas été confirmé par l'isolement du virus. En 2000, un foyer est apparu sur des bovins importés dans l'île Maurice ; le diagnostic a été confirmé par microscopie électronique.

Identification de l'agent pathogène : le moyen le plus rapide de confirmation de la maladie chez les bovins est la mise en évidence au laboratoire des particules virales du Capripoxvirus soit dans les biopsies, soit dans les croûtes lésionnelles par examen en microscopie électronique directe après coloration négative, ce dans le cas d'une affection nodulaire cutanée généralisée accompagnée d'une hypertrophie des nœuds lymphatiques superficiels. Le Capripoxvirus responsable de la DNC est différent des parapoxvirus agents de la stomatite papuleuse bovine et de la pseudo-cowpox, mais il ne peut pas être différencié au plan morphologique des virus de la vaccine et de la variole bovine, toutes deux des infections du bétail causées par des orthopoxvirus. Aucune de ces dernières n'est cependant à l'origine d'infections généralisées chez les bovins. En outre, elles sont relativement peu fréquentes. Le virus de la DNC se multiplie dans des cultures de tissus d'origine bovine, ovine ou caprine, son titre maximum étant atteint sur cellules de testicule d'agneau. Il engendre un effet cytopathogène (ECP) caractéristique avec présence de corps d'inclusion intracytoplasmiques, distinct de celui du virus de la pseudo-dermatose nodulaire contagieuse (thélite ulcérate herpétique ou maladie d'Allerton), due à un herpèsvirus produisant des syncytiums et des corps d'inclusion intranucléaires. Les antigènes du Capripoxvirus peuvent être mis en évidence en culture de tissu par les techniques d'immunoperoxydase ou par immunofluorescence, et le virus peut être neutralisé par des anticorps spécifiques.

La détection de l'antigène par une méthode immuno-enzymatique (ELISA) a été mise au point en utilisant un sérum polyclonal produit à partir d'un antigène de Capripoxvirus immunodominant recombinant. La détection du génome a pu être également réalisée en utilisant des amorces spécifiques pour les gènes codant les protéines de fusion et les protéines d'attachement et une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisable tant sur des échantillons de tissu que sur le sang été décrite.

Épreuves sérologiques : l'épreuve sérologique la plus spécifique est la séroneutralisation virale ; mais, comme l'immunité vis-à-vis de l'infection est à prédominance cellulaire, cette épreuve n'est pas suffisamment sensible pour identifier les animaux qui ont été en contact avec le virus et qui ont développé des anticorps neutralisants à des titres peu élevés. L'épreuve d'immunodiffusion en

gélose et l'épreuve d'immunofluorescence indirecte sont moins spécifiques du fait des réactions croisées avec d'autres poxvirus. Le western blot faisant appel à la réaction entre l'antigène P32 du virus et les sérums à tester est à la fois spécifique et sensible mais il est coûteux et difficile à mettre en œuvre. L'utilisation de cet antigène, exprimé par un vecteur approprié, dans un ELISA offre la perspective d'un test sérologique acceptable et normalisé.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : toutes les souches de capripoxvirus examinées jusqu'à présent, qu'elles soient issues de bovins, de moutons ou de chèvres, ont des antigènes immunisants communs. Des souches atténuées issues de bovins ou de souches isolées de mouton ou de chèvre ont été utilisées comme vaccins à virus vivant.

A. INTRODUCTION

La dermatose nodulaire contagieuse (DNC) a été isolée pour la première fois en Zambie en 1929, s'étendant au Botswana en 1943 (16) puis en Afrique du Sud où elle affecta plus de 8 millions de bovins, occasionnant d'énormes pertes économiques. En 1957, elle fit son apparition au Kenya, associée à la variole ovine (28). En 1970, elle diffusa dans le Nord du Soudan ; en 1974, elle s'étendit à l'ouest jusqu'au Nigeria et, en 1977, atteignit la Mauritanie, le Mali, le Ghana et le Libéria. D'autres épizooties de DNC affectèrent, entre 1981 et 1986, la Tanzanie, le Kenya, le Zimbabwe, la Somalie et le Cameroun occasionnant la mortalité de 20 % des animaux infectés. Cependant, l'étendue véritable de l'épizootie reste mal connue et il est vraisemblable qu'elle affecte une grande partie du centre de l'Afrique. En 2000/2001, une autre grande épizootie s'est répandue dans toute l'Afrique sub-saharienne (11). En 1988, elle était bien installée en Égypte, et, en 1989, la présence d'un foyer était rapportée en Israël. La DNC doit être considérée comme une maladie pouvant s'étendre hors d'Afrique. Son principal mode de transmission est mécanique, en particulier par les piqûres d'arthropodes vecteurs (6, 9).

La sévérité des signes cliniques de la DNC est fonction de la souche de capripoxvirus en cause et de l'espèce affectée. *Bos taurus* est plus sensible à la maladie que *Bos indicus*. Le buffle asiatique peut également être atteint par la maladie. La race peut aussi revêtir une certaine importance car les lignées à peau fine Channel Island développent une maladie plus sévère, les vaches en lactation étant les plus sensibles au virus. Cependant, de grandes variations cliniques peuvent être observées au sein même d'un groupe d'animaux élevés ensemble dans des conditions similaires, depuis l'infection inapparente jusqu'à la mort (7). Au sein d'un troupeau, certains animaux peuvent très bien ne pas être infectés si la prévalence vectorielle est faible.

Dans le cas d'une infection aiguë, on observe une hyperthermie initiale qui peut dépasser 41 °C et persister durant 1 semaine. La durée de l'incubation, dans les conditions naturelles, n'a pas été rapportée, mais le pic thermique débute 6 à 9 jours après l'inoculation expérimentale. Une rhinite et de la conjonctivite apparaissent et, chez les vaches en lactation, la sécrétion lactée diminue. Des nodules de 2 à 5 mm de diamètre se développent sur le corps, en particulier sur la tête, l'encolure, la mamelle et le périnée entre 7 et 19 jours après l'inoculation (11). Ces nodules envahissent le derme et l'épiderme, et peuvent au début laisser exsuder un peu de sérosité mais, au cours des 2 semaines suivantes, ils se nécrosent et forment des ulcères dans toute l'épaisseur de la peau. Tous les ganglions lymphatiques superficiels sont hypertrophiés, les membres peuvent être le siège d'œdèmes importants et l'animal a du mal à se déplacer. Les nodules localisés sur les muqueuses des yeux, du mufle, de la bouche, du rectum et des organes génitaux, ainsi que sur la peau de la mamelle s'ulcèrent rapidement et toutes les sécrétions sont virulentes. Suivant la gravité des signes cliniques, les excréments oculo-nasaux deviennent muco-purulents, et une kératite peut se développer. Les nodules peuvent aussi apparaître dans la bouche, le tissu sous-cutané et les muscles, la trachée et le tube digestif, en particulier dans le rumen et les poumons, occasionnant une pneumonie primaire et secondaire. Les animaux en gestation peuvent avorter et certaines publications font état de fœtus couverts de nodules. Les taureaux peuvent devenir temporairement ou définitivement stériles et le virus peut être excrété longtemps dans le sperme (18). La guérison d'une infection sévère est lente : l'animal est émacié ; il peut subsister une pneumonie et une métrite ; les lésions nécrotiques « clouteuses » de la peau, qui peuvent être aggravées par des attaques d'insectes, laissent de profondes cicatrices dans le tissu cutané (23).

La dermatose nodulaire contagieuse n'est pas transmissible à l'homme.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

• Collecte et préparation de l'échantillon

Le matériel pour la préparation et l'isolement de l'antigène doit être récolté par biopsie ou, sur un animal mort, par prélèvement de nodules cutanés, de lésions pulmonaires ou de noeuds lymphatiques. Les échantillons destinés à l'isolement du virus et à la mise en évidence de l'antigène par une méthode immuno-enzymatique (ELISA) doivent être récoltés au cours de la première semaine suivant l'apparition des signes cliniques, avant l'apparition des anticorps neutralisants (12, 13). Les échantillons destinés à la détection du génome viral par une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) peuvent être récoltés quand les anticorps sont apparus. Dès l'apparition des lésions cutanées, le virus peut être isolé jusqu'à 35 jours après et l'acide nucléique peut être mis en évidence par PCR jusqu'à 3 mois après (26, 27). La fraction leucocytaire (« buffy coat ») récoltée à partir de sang hépariné ou additionné d'EDTA (acide éthylène-diamine-tétra-acétique) au cours du stade virémique de la maladie (avant la généralisation des lésions ou dans les 4 jours qui suivent) peut aussi être utilisée pour l'isolement viral. Les échantillons destinés à l'histologie doivent inclure les marges de la lésion et être placés immédiatement après leur prélèvement dans un flacon contenant un volume de formol à 10 % équivalent à 10 fois celui de la lésion.

Les tissus conservés dans du formol ne nécessitent pas de précautions particulières pour leur transport. Les prélèvements sanguins sur anticoagulant destinés à l'isolement du virus à partir de la fraction leucocytaire doivent être placés immédiatement dans de la glace et traités aussi vite que possible. Dans la pratique, ils peuvent être conservés à 4 °C pendant plus de 2 jours avant leur traitement, mais ils ne doivent en aucun cas être congelés ou maintenus à température ambiante. Les tissus destinés à l'isolement du virus ou à la détection de l'antigène doivent être conservés à 4 °C dans la glace ou à -20 °C. Si le transport des prélèvements ne peut être effectué sur de longues distances sous froid, le milieu de transport devra contenir 10 % de glycérol ; la taille des échantillons devra alors être suffisante pour que le milieu de transport ne pénètre pas au cœur du prélèvement qui servira à l'isolement viral.

Le matériel destiné à l'histologie devra être préparé suivant les techniques usuelles et colorées à l'hématoxyline-éosine (HE) (2). Les prélèvements destinés à l'isolement du virus et de l'antigène sont dissociés à l'aide de ciseaux et de pinces stériles, broyés au mortier avec du sable stérile et un volume équivalent de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) additionné de pénicilline sodée (1 000 Unités Internationales [UI]/ml), de sulfate de streptomycine (1 mg/ml), de mycostatine (100 UI/ml) ou de fongizone (2,5 µg/ml) et de néomycine (200 UI/ml). La suspension est congelée-décongelée 3 fois de suite puis partiellement clarifiée par centrifugation à 600 *g* pendant 10 min. La fraction leucocytaire peut être recueillie à partir du sang hépariné par centrifugation à 600 *g* pendant 15 min et remise précautionneusement en suspension dans 5 ml d'eau bidistillée réfrigérée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Après un temps de latence de 30 s, on rajoute à cette suspension 5 ml de milieu de croissance réfrigéré concentré 2 fois. Le mélange est alors centrifugé à 600 *g* pendant 15 min ; le surnageant est éliminé et le culot cellulaire suspendu dans un milieu de croissance comme le milieu de Eagle modifié par Glasgow (GMEM). Après centrifugation à 600 *g* pendant 15 min, le culot est recueilli et à nouveau suspendu dans 5 ml de GMEM frais. Une technique alternative consiste à séparer la fraction leucocytaire de l'échantillon de sang hépariné par utilisation d'un gradient Ficoll.

a) Culture

Le virus de la DNC est apte à se multiplier dans des tissus d'origine bovine, ovine ou caprine en culture, bien que les cultures de cellules de première ou seconde explantation de testicule d'agneau soient considérées comme les plus sensibles, particulièrement celles issues d'une lignée de moutons à laine. Les échantillons de prélèvement préparés comme ci-dessus, par exemple 1 ml de surnageant de broyat cellulaire ou de plasma clarifié, sont inoculés à des cultures de cellules en boîtes de 25 cm² puis placés pour adsorption à 37 °C pendant 1 h. La culture est ensuite lavée avec du tampon PBS chaud (37 °C) et recouverte de 10 ml d'un milieu adéquat tel que le GMEM additionné d'antibiotiques et de 2 % de sérum de veau foetal. On pourra aussi, les inoculer à des tubes dits de tubes de Leighton contenant des lamelles de verre sur lesquelles on aura au préalable fait pousser des cellules sensibles, si l'on en dispose.

Les flacons seront examinés quotidiennement pendant 14 jours pour rechercher un éventuel effet cytopathogène (ECP) sur les cultures et le milieu sera changé lorsqu'il deviendra trouble. Les cellules infectées développent un ECP caractéristique se manifestant par la rétraction de la membrane, éventuellement par l'arrondissement des cellules et la margination de la chromatine nucléaire. Au début, seules pourront être observées quelques petites zones d'ECP, parfois dès le 2^e jour suivant l'infection ; dans les 4 à 6 jours qui suivent, l'ECP s'étend à la totalité du tapis. S'il n'est pas décelable au 14^e jour, la culture devra subir 3 congélations-décongélations successives, puis être clarifiée par centrifugation, et le surnageant sera repris et inoculé à de nouvelles cultures de cellules de testicule d'agneau. Au premier signe d'ECP ou dès les premiers signes de dégénérescence cellulaire affectant les cultures sur lamelles de verre,

celles-ci doivent être retirées des tubes, fixées à l'acétone (à -20°C) et colorées par l'hématoxyline-éosine. Le diagnostic de l'infection par un poxvirus se fait par la mise en évidence dans le cytoplasme de corps d'inclusion éosinophiles, de taille variable mais supérieure à la moitié de celle du noyau et entourés par un halo clair. L'ECP peut être éliminé ou atténué par l'adjonction au milieu de culture d'un sérum spécifique anti-dermatose nodulaire contagieuse. L'herpès-virus de la pseudo dermatose nodulaire contagieuse (Maladie d'Allerton) produit des corps d'inclusion intranucléaires de type A de Cowdry. La formation de syncytiums n'est pas caractéristique de l'infection par un capripoxvirus, à la différence de l'herpèsvirus responsable de la pseudo-dermatose nodulaire contagieuse.

Les souches de capripoxvirus responsables de la DNC ont été adaptées à la culture sur membrane chorio-allantoïdienne d'œuf embryonné de poule ainsi qu'aux cellules rénales en lignée continue de singe vert africain (Vero).

- **Microscopie électronique**

Avant d'effectuer les opérations de centrifugation, le matériel issu de la biopsie originale et en suspension dans du PBS, est traité en vue de son examen en microscopie électronique à transmission. Une gouttelette de cette suspension est déposée sur une grille de microscopie électronique de 400 mesh hexagonales, préalablement recouverte d'un film de nitrocellulose renforcé par des projections de carbone en vapeur de pentylamine. Au bout de 1 min, la grille est transférée à l'aide de pinces spéciales dans une goutte de tampon Tris/EDTA à pH 7,8 durant 20 s puis dans une goutte d'acide phosphotungstique à 1 % et à pH 7,2 pendant 10 s. Le surplus de suspension est éliminé par adsorption sur un morceau de papier filtre, puis la grille est séchée par agitation à l'air et placée dans le réceptacle porte-grille du microscope électronique. Le capripoxvirus a la forme d'une « brique » recouverte de courts éléments tubulaires entrecroisés qui mesurent approximativement $290 \times 270 \text{ nm}$. Une membrane dérivée de la cellule-hôte peut englober certains virions et il faudra autant que possible effectuer plusieurs examens pour confirmer le diagnostic (21).

Les capripox virus ne peuvent être morphologiquement différenciés des orthopoxvirus mais, mis à part les virus de la vaccine et de la variole qui sont tous les deux rares chez le bétail et ne causent pas d'infection généralisée, aucun autre orthopoxvirus ne cause de lésions chez les bovins. Cependant, le virus de la vaccine peut être à l'origine d'une infection généralisée chez les jeunes veaux immunodéprimés. À l'inverse, les orthopoxvirus sont communément la cause d'affections cutanées chez le buffle, en particulier celui de la variole du buffle, maladie qui se manifeste habituellement par la présence de lésions nodulaires sur les trayons mais qui peut causer des lésions en d'autres sites tels que le périnée, la partie médiane des épaules et la tête. L'orthopoxvirus à l'origine de la variole du buffle ne peut pas être facilement distingué en microscopie électronique des capripoxvirus. Les parapoxvirus à l'origine de la stomatite papuleuse et de la pseudo-variole sont plus petits, de forme ovale et recouverts par un simple élément tubulaire continu qui donne l'aspect de striation que l'on observe à la surface du virion. Le capripoxvirus est également différent de l'herpèsvirus responsable de la pseudo-dermatose nodulaire contagieuse (maladie d'Allerton).

b) Méthodes immunologiques

- **Épreuves d'immunofluorescence**

L'antigène du capripoxvirus peut aussi être identifié par immunofluorescence sur cultures infectées des lamelles de verre des tubes de Leighton. Ces lamelles ou lames couvre-objet peuvent être lavées au PBS, séchées à l'air et fixées dans l'acétone à -20°C pendant 10 min. L'épreuve indirecte faisant appel à un immune-sérum bovin est sujet à de trop grandes variations de la couleur de fond et à l'origine de réactions non spécifiques. Cependant, un conjugué direct peut être préparé à partir de sérums de bovins convalescents (ou de moutons ou chèvres convalescents de variole caprine) ou, encore, de lapins hyperimmunisés avec du capripoxvirus purifié. Des cultures de cellules non infectées doivent être utilisées comme témoins négatifs en raison des réactions croisées provoquées par les anticorps du sérum rajouté à la culture cellulaire et qui peuvent poser des problèmes.

- **Épreuves d'immunodiffusion en gélose**

Une épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) a été utilisée pour détecter les antigènes précipitants du capripoxvirus mais le désavantage de cette technique est que cet antigène partage une partie commune avec les parapoxvirus. De l'agarose à 1 % est préparé en tampon borate à pH 8,6, dissous par chauffage et 2 ml est déposé sur une lame de verre de microscope ($76 \times 26 \text{ mm}$). Lorsque l'agar est solidifié, 6 puits sont découpés en rosette autour d'un puits central. Chaque puits, d'un diamètre de 5 mm, est placé à 7 mm de distance du milieu du puits central et du milieu de chacun des puits périphériques voisins. Ces puits sont remplis de la façon suivante : 18 μl de la suspension préparée à partir de la lésion sont placés dans trois des puits périphériques, en alternance avec la suspension d'antigène positif servant de contrôle, et 18 μl de sérum positif anti-capripoxvirus témoin sont déposés dans le puits central. Les lamelles sont placées dans une chambre humide à la température du laboratoire pendant 48 h puis examinées par transparence à l'aide

d'une boîte lumineuse afin de visualiser les lignes de précipitation. L'échantillon est positif si une ligne de précipitation confluyente se développe entre le sérum témoin et l'antigène positif témoin.

L'antigène destiné aux réactions d'immunodiffusion en gélose est préparé de la manière suivante : 1 ou 2 flacons de culture cellulaire de TA de 125 cm² sont inoculés avec du capripoxvirus et congelés-décongelés 2 fois lorsque l'ECP atteint 90 % (8 à 12 jours). Les cellules infectées cultivées dans leur milieu sont décollées de leur support par agitation puis centrifugées à 4 000 *g* pendant 15 min. La majeure partie du surnageant est recueillie et conservée sous régime du froid, et le culot est remis en suspension dans le reste du surnageant. Les cellules doivent ensuite être lysées par action des ultrasons pendant 60 s environ. La préparation homogène obtenue est centrifugée comme précédemment, et le surnageant est dès lors aliquoté après avoir été additionné d'un volume équivalent de sulfate d'ammonium saturé à pH 7,4. Après avoir été maintenue pendant 1 h à 4 °C, la suspension est centrifugée à 4 000 *g* pendant 15 min, et le culot recueilli est à nouveau suspendu dans un petit volume de solution saline à 0,8 % en attendant son utilisation dans la réaction d'immunodiffusion. Les cultures non infectées subissent un traitement analogue pour produire un antigène tissulaire témoin (20).

- **Méthode immuno-enzymatique**

Suite au clonage de la protéine structurale P32 hautement antigénique du capripoxvirus, il est possible d'utiliser l'antigène recombinant exprimé pour la production de réactifs de diagnostic, entre autres un antisérum polyclonal spécifique de la protéine P32, et la production d'anticorps monoclonaux. Ces réactifs ont facilité le développement d'un ELISA hautement spécifique (5). En utilisant un antisérum de lapin obtenu par inoculation de lapins avec du capripoxvirus purifié, de l'antigène de capripox peut être mis en évidence sur une plaque ELISA dans des extraits de biopsies ou du surnageant de cultures cellulaires infectées. La présence de l'antigène peut également être démontrée en utilisant un sérum de cobaye préparé contre une protéine structurale P32 spécifique de groupe, une préparation commerciale d'immunoglobuline de lapin anti-cobaye conjuguée à la peroxydase de radis et une solution substrat/chromogène.

c) Méthodes de reconnaissance de l'acide nucléique

La PCR est une technique rapide et sensible pour la détection du génome des capripoxvirus dans du sang additionné d'EDTA, dans des biopsies ou des cultures de tissu. Cependant, elle ne permet pas la différenciation entre les virus de la DNC, de la clavelée ou de la variole caprine. Les amorces pour les gènes de la protéine d'attachement et de la protéine de fusion (17) sont spécifiques pour toutes les souches du genre *Capripoxvirus*. Par l'étude des séquences ou de la phylogénétique, les souches de virus peuvent être identifiées ; ce travail doit être conduit dans des laboratoires de référence. Les différentes souches de virus peuvent aussi être caractérisées par comparaison de leurs fragments de génome obtenus par la digestion enzymatique de leur ADN purifié par Hind III (1, 3, 19). Cette technique a permis de mettre en évidence des différences entre les isolats issus des différentes espèces mais ces différences ne sont pas conséquentes ; en outre, il a été montré des échanges de souches entre les espèces et même la recombinaison entre souches du terrain (14, 15).

Le génome du virus de la DNC comporte vraisemblablement 156 gènes (25). Un exemple de protocole publié pour une PCR est décrite ci-dessous (26).

- **Réaction d'amplification en chaîne par polymérase**

- **Protocole**

- i) Congeler et décongeler 200 µl de sang additionné d'EDTA et le suspendre dans 1000 µl de tampon de lyse.
- ii) Découper les échantillons de peau ou d'autres tissu en petits morceaux avec des ciseaux et des pinces stériles ou des lames de scalpel à usage unique. Broyer dans un mortier avec un pilon. Suspendre l'échantillon dans 1000 µl de tampon de lyse [tampon de lyse : 60 g de thiocyanate de guanidine ; 0,378 g de chlorure de potassium (KCl) ; 1 ml de Tris (1 M, pH 8) et 0,5 ml de Tween 20 dans 100 ml d'eau exempte de nucléase].
- iii) Ajouter 1 µl de protéinase K (20 mg/ml, Invitrogen) dans les échantillons de sang et 10 µl de protéinase K dans les échantillons de tissu. Incuber dans un four à 56 °C pendant 2 h, puis chauffer à 100 °C pendant 10 min, afin d'inactiver les enzymes. Ajouter 300 µl d'un mélange de phénol/chloroforme/alcool isoamyl (25:24:1) dans les échantillons de sang et 1000 µl dans les échantillons de tissu. Passer au vortex et incuber à température ambiante pendant 10 min. Centrifuger les échantillons à 10 000 *g* pendant 15 min à 4 °C. Récupérer soigneusement la phase aqueuse supérieure et transférer dans un tube propre de 2 ml. Ajouter deux volumes d'éthanol glacé (100 %). Placer les échantillons à -20 °C pendant 1 h afin de précipiter l'ADN. Centrifuger de nouveau à 10 000 *g* pendant 15 min à 4 °C et éliminer le surnageant. Laver les culots avec de l'éthanol à 70 %

(100 µl) et centrifuger à 10 000 *g* pendant 1 min à 4 °C. Éliminer le surnageant et sécher soigneusement les culots. Suspendre les culots dans 30 µl d'eau exempte de nucléase (26).

- iv) Les amorces mises au point à partir du gène codant la protéine d'attachement sont décrites par Ireland & Binopal (1998). La taille de l'amplicon est de 192 pb. Les amorces ont les séquences suivantes:

Amorce de tête : 5'-TTT-CCT-GAT-TTT-TCT-TAC-TAT-3'

Amorce de queue : 5'-AAA-TTA-TAT-ACG-TAA-ATA-AC-3'.

- v) L'amplification de l'ADN est réalisée sous un volume final de 50 µl contenant : 5 µl de tampon PCR concentré 10 fois, 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl d'amorce de tête, 1 µl d'amorce de queue, 1 µl de matrice ADN, 0,5 µl de *Taq* polymérase et 39 µl d'eau exempte de nucléase. Le volume de la matrice ADN nécessaire peut varier et le volume d'eau exempte d'eau doit être ajusté pour un volume final de 50 µl.
- vi) Incuber les échantillons dans le thermo-cycleur : premier cycle : 2 min à 95 °C (étape initiale de dénaturation), deuxième cycle : 45 s à 95 °C, 50 s à 50 °C et 1 min à 72 °C. Répéter le deuxième cycle 34 fois. Dernier cycle : 2 min à 72 °C (étape finale d'élongation) et conserver à 4 °C jusqu'à analyse.
- vii) Mélanger 10 µl de chaque échantillon avec une solution de coloration et placer sur un gel d'agarose à 1,5 % dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA). Sur une ligne parallèle, placer un marqueur ADN pour 100 pb. Séparer les produits à 80 V pendant 30 à 40 min et visualiser.

2. Épreuves sérologiques

Tous les virus du genre Capripoxvirus ont en commun un antigène majeur pour les anticorps neutralisants et il n'est donc pas possible de distinguer les souches de capripoxvirus de bovins, d'ovins et de caprins sur la base des techniques sérologiques.

a) Séroneutralisation du virus

Un sérum à tester peut être titré vis-à-vis d'un titre constant (100 DICT₅₀ [Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) du capripoxvirus, ou bien une souche de référence de virus peut être titrée vis-à-vis d'une dilution constante de sérum de référence, ce dans le but de calculer un index de neutralisation. Du fait des variations de sensibilité des cultures tissulaires au capripoxvirus et des difficultés conséquentes d'obtention de 100 DICT₅₀, la méthode de choix reste l'index de neutralisation. La description de cette épreuve fait appel à l'utilisation de micro-plaques de titrage à 96 puits à fond plat pour culture cellulaire mais on peut aussi bien employer des tubes de culture en utilisant le volume de milieu de culture approprié, bien qu'il soit plus difficile de déterminer un titre précis en tube. L'utilisation de cellules Vero dans ce type d'épreuve de neutralisation donnerait de meilleurs résultats.

• Protocole

- i) Les sérums à tester incluant un sérum témoin positif et un négatif sont dilués au 1/5 dans du milieu HEPES de Eagle (N-2-hydroxyethylpipérazine, N-2-acide sulfonique-éthane) puis inactivés à 56 °C pendant 30 min.
- ii) 50 µl de sérum préalablement inactivé sont ensuite additionnés au contenu des cupules des colonnes 1 et 2, rangées A à H de la plaque de microtitrage. Le second sérum est placé dans les cupules des colonnes 3 et 4, le troisième dans les colonnes 5 et 6, le sérum témoin positif dans les colonnes 7 et 8, le sérum témoin négatif dans les colonnes 9 et 10, et 50 µl de milieu HEPES de Eagle sans sérum sont déposés dans les colonnes 11 et 12 et dans tous les puits de la rangée H.
- iii) Une souche de référence de capripoxvirus, habituellement une souche de vaccine connue pour ses aptitudes à pousser facilement en culture de tissu ayant un titre logarithmique supérieur à 6 DICT₅₀ par ml, est diluée dans du milieu HEPES de Eagle et répartie dans des flacons-bijoux afin d'obtenir une série d'échantillons de virus dilués respectivement à 1/50, 1/40, 1/35, 1/20 et 1/15 DICT₅₀ par ml (équivalant en log₁₀ à 3,7 ; 2,7 ; 2,2 ; 1,7 ; 1,2 ; 0,7 et 0,2 DICT₅₀ par 50 µl).
- iv) Commencer par les puits de la rangée G et par la préparation virale la plus diluée en distribuant 50 µl dans chaque puits de la rangée. On répétera l'opération avec chaque dilution virale, la dilution de titre viral le plus élevé étant placée dans le puits A.
- v) Les plaques sont recouvertes par un couvercle ou un film plastique et placées dans une étuve pendant 1 h à 37 °C.
- vi) Une suspension de cellules de TA dans du milieu de Eagle additionné d'antibiotiques et de 2 % de sérum de veau foetal est préparée à partir de tapis cellulaires préalablement établis à raison de 10⁵ cellules/ml. A l'issue de l'incubation des plaques de titrage à 37 °C, 100 µl de suspension cellulaire

sont ajoutés à tous les puits, à l'exception des puits H11 et H12 qui servent de témoins pour le milieu. Les autres puits de la rangée H sont les témoins cellules et sérum.

- vii) Les plaques de titrage sont couvertes comme précédemment et mises à incuber pendant 1 h à 37 °C pendant 9 jours.
- viii) Les tapis cellulaires sont examinés quotidiennement pendant 4 jours pour la recherche d'un éventuel ECP à l'aide d'un microscope inversé. Les cellules de la rangée H ne doivent pas présenter d'ECP. Si l'on a utilisé la souche de capripoxvirus vaccinal 0240 KSGP, la lecture finale doit être effectuée le 9^e jour suivant l'inoculation, et le titre du virus sera calculé suivant la méthode de Kärber (1931). Si la lecture est différée, il se produit une dissociation du complexe Antigène-anticorps et le virus initialement neutralisé se sépare de l'anticorps.
- ix) *Interprétation des résultats* : le titre neutralisant correspond à la différence logarithmique entre le titre obtenu avec un sérum négatif et celui du sérum à tester. Une réduction de titre supérieure ou égale à 1,5 log correspond à un sérum positif. Le test peut être plus sensible lorsque l'on utilise un couple de sérums issu d'un même animal avant et après infection. Ce en raison du fait que, suite à une infection par le capripoxvirus, l'immunité à médiation cellulaire prédomine ; un résultat négatif, particulièrement consécutif à une vaccination à l'issue de laquelle la réponse immunitaire est nécessairement faible, ne signifie donc pas que l'animal dont le sérum est issu n'est pas protégé.

On a décrit une méthode à virus constant et sérum variable utilisant des dilutions de sérum s'étalant entre 1/5 et 1/500 et faisant appel à des cellules musculaires d'embryon de bovin. Du fait que la sensibilité de ces cellules au capripoxvirus est plus faible que celle des cellules de TA, le problème de dissociation du complexe antigène-anticorps est résolu.

Les anticorps dirigés contre le capripoxvirus dès le second jour suivant le début des signes cliniques. Ils restent détectables durant 7 mois, mais un accroissement significatif de leur titre peut être mis en évidence entre les 21^e et 42^e jours.

b) Immunodiffusion en gélose

L'épreuve d'immunodiffusion en gélose ne peut être recommandée comme épreuve sérologique de diagnostic de la DNC du fait de la réaction croisée avec la stomatite papuleuse et la pseudo-cowpox, à l'origine de résultats faussement positifs. La perte de sensibilité de l'épreuve peut aussi engendrer des résultats faussement négatifs.

c) Épreuve de détection des anticorps par immunofluorescence indirecte

Les cultures de tissu infectées sur lamelles de tubes de Leighton ou sur lames de microscope peuvent être utilisées pour les épreuves de détection des anticorps par immunofluorescence indirecte. Des cultures de tissu témoin non infectées et des sérums témoins positif et négatif seront inclus dans l'épreuve. Les cultures infectées et les témoins sont fixés dans l'acétone à –20 °C pendant 10 min et conservées à 4 °C. Les sérums à éprouver seront dilués dans le tampon PBS à partir du 1/20 ou du 1/40, et la positivité éventuelle de la réaction sera mise en évidence en utilisant des gamma-globulines anti-bovin conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine. Des réactions croisées peuvent se produire avec les virus de l'ecthyma, de la stomatite papuleuse et, peut-être également, avec d'autres poxvirus.

d) Analyse par western blot

L'analyse par western blot des sérums à éprouver contre un lysat cellulaire infecté par le capripoxvirus est un système sensible et spécifique, utilisable pour la détection des anticorps dirigés contre les protéines structurales du capripoxvirus mais cette épreuve est coûteuse et difficile à mettre en œuvre.

Les cellules de TA infectées par le capripoxvirus doivent être récoltées lorsque l'ECP atteint 90 % ; elles sont alors congelées-décongelées 3 fois de suite et les débris cellulaires culottés par centrifugation. Le surnageant doit être décanté et les protéines séparées par SDS/PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide/dodécyl sulfate de sodium). Un système de gel vertical discontinu faisant appel à un stacking gel à 5 % d'acrylamide en tampon Tris (125 mM), pH 6,8 et SDS (0,1 %) et à un gel de résolution constitué par de l'acrylamide (entre 10 et 12,5 %) en Tris (560 mM), pH 8,7 et du SDS (0,1 %) est recommandé pour cette utilisation avec un tampon – glycine courant contenant du Tris (250 mM), de la glycine (2 M), et du SDS (0,1 %). Les échantillons de surnageant doivent être chauffés par ébullition pendant 5 min dans un tampon de lyse approprié avant d'être chargés sur le gel. Alternativement du virus purifié ou des antigènes recombinants peuvent être utilisés à la place de l'antigène issu de la culture de tissu.

Des marqueurs de poids moléculaire doivent être déposés en même temps que les échantillons de protéines. Les protéines séparées sur gel de polyacrylamide doivent être transférées électrophorétiquement sur une membrane de nitrocellulose. Après le transfert, la membrane est rincée minutieusement en PBS puis bloquée en tampon PBS additionné de 3 % de sérum albumine bovine ou en PBS additionné de 5 % de lait en poudre. Cette opération devra être réalisée sur un agitateur-balançoire durant une nuit à 4 °C. La

membrane de nitrocellulose est ensuite découpée en bandes soit à l'aide d'un appareil permettant d'éprouver en même temps un grand nombre de sérums, soit manuellement, chaque bande étant traitée séparément par la suite. La membrane est lavée minutieusement dans 5 bains successifs de PBS pendant 5 min sur agitateur puis incubés à température ambiante pendant 1,5 h sur l'agitateur avec le sérum approprié dilué au 1/50 dans le tampon de blocage (PBS avec 3 % de sérum albumine bovine et 0,05 % de Tween 20 ou PBS avec 5 % de lait en poudre et 0,05 % de Tween 20). La membrane est à nouveau lavée minutieusement et incubée (dans le tampon de blocage) avec des immunoglobulines anti-espèce conjuguées à la peroxydase à une dilution déterminée par titrage. Après une nouvelle incubation à température ambiante pendant 1,5 h, la membrane est lavée, et une solution de tétra-hydrochlorure de diaminobenzidine (10 mg dans 50 ml de tampon Tris-HCl, pH 7,5 et 20 µl de peroxyde d'hydrogène à 30 % [poids/poids]) est ajoutée. Après une incubation de 3 à 7 min à température ambiante sur agitateur et sous observation constante, la réaction est stoppée par lavage en PBS avant qu'une coloration trop importante du fond ne se manifeste. Un sérum témoin positif et un sérum témoin négatif doivent être utilisés dans chaque épreuve.

Les échantillons positifs et le témoin positif doivent produire une réponse conforme à celle attendue pour des protéines de poids moléculaire de 67, 32, 26, 19 et 17 kDa (les protéines structurales majeures du capripoxvirus), tandis que les sérums négatifs ne donneront pas de réaction. Un sérum hyperimmun préparé vis-à-vis des parapoxvirus (stomatite papuleuse bovine, pseudo-variole) réagira avec plusieurs protéines du capripox virus mais pas avec la protéine de 32 kDa spécifique du capripoxvirus.

e) Méthode immuno-enzymatique

Un test ELISA pour la détection des anticorps dirigés contre le capripoxvirus a été mis au point en utilisant la protéine structurale P32 exprimée par le capripoxvirus et des anticorps monoclonaux préparés contre cette protéine (8).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Deux souches atténuées de capripoxvirus ont été utilisées dans la fabrication de vaccins spécifiques de la DNC (3, 4), d'une part une souche ovine du Kenya et un virus de la variole caprine ayant subi 18 passages sur cellules de TA ou sur cellules foetales de muscle de veau, d'autre part une souche d'Afrique du Sud ayant subi 60 passages sur cellules rénales d'agneau et 20 passages sur membrane chorioallantoïdienne d'œuf embryonné. Toutes les souches de capripoxvirus examinées, qu'elles proviennent de bovin, d'ovin ou de caprin, ont un site neutralisant majeur commun, ce qui détermine le fait que tout animal ayant guéri d'une affection causée par l'une des souches est résistant à l'infection causée par l'une des autres. En conséquence, il est possible de protéger les bovins contre la DNC en utilisant des souches de capripoxvirus issues de moutons ou de chèvres (10). En 1989 et 1990, la souche roumaine de variole ovine a été utilisée pour contrôler les foyers de DNC en Égypte (22). Cependant, il est indispensable d'effectuer des contrôles préalables, tout particulièrement dans les races les plus sensibles à l'acmé de la lactation, avant d'introduire une souche vaccinale non habituellement utilisée chez les bovins. La protection conférée par la vaccination persiste vraisemblablement toute la vie malgré la chute de l'immunité car le capripoxvirus se réplique au niveau du site d'inoculation, mais ne provoque pas d'infection généralisée. Les deux souches de capripoxvirus utilisées en routine dans les vaccins sont susceptibles de produire une vaste réaction locale au site d'inoculation, notamment dans les races de *Bos taurus* (11), ce que certains éleveurs acceptent difficilement. Ce fait a parfois empêché l'utilisation du vaccin, même si les conséquences pathologiques engendrées par un foyer de DNC sont inévitablement plus sévères.

Une nouvelle génération de vaccins contre les capripoxvirus, en cours de mise au point, fait appel au génome du capripoxvirus comme vecteur de gènes d'autres agents pathogènes pour les ruminants, comme par exemple les gènes des virus de la peste bovine ou de la peste des petits ruminants. Ce vaccin recombinant confère une protection à la fois contre la DNC et la peste bovine à la suite d'une seule vaccination (24, 27).

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Les souches de capripox virus utilisées pour la production des vaccins doivent être accompagnées d'un document mentionnant leur origine et le nombre de passages en culture ou sur animaux qu'elles ont subi. Elles doivent être inoffensives afin de pouvoir être utilisées chez tous les animaux auxquels elles sont destinées, y compris les femelles en gestation. Elles ne doivent également pas être transmissibles, rester atténuées à la suite d'un passage ultérieur en culture cellulaire et engendrer une protection totale durant une année au moins à la suite d'une épreuve virulente. Une certaine quantité de la semence primaire

vaccinale doit être préparée et conservée en vue de permettre la constitution d'une semence de travail destinée à une production régulière de vaccin.

b) Méthodes de culture

Les vaccins doivent être lyophilisés et conservés dans des fioles de 2 ml à -20°C . Elles peuvent aussi être conservées non déshydratées à -20°C mais, dans cet état, elles sont plus stables à -70°C ou à une température inférieure. Le virus doit être produit sur des cellules de TA, voire de cellules de mouton, en culture cellulaire de première ou seconde explantation afin d'obtenir une production virale maximale. Les cellules VERO peuvent également être utilisées pour cette production.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Les lots de virus doivent présenter les caractéristiques suivantes :

- i) *Pureté* : ils doivent être exempts de contaminants viraux, en particulier de pestivirus tels que ceux de la Border disease et de la Maladie des muqueuses, de bactéries, de champignons et/ou de mycoplasmes.
- ii) *Sécurité* : ils doivent produire un minimum de réactions cliniques dans toutes les races de bovin chez lesquelles il est utilisé dans le respect des voies recommandées.
- iii) *Efficacité* : ils doivent stimuler l'immunité des bovins quelle que soit leur race pendant au moins 1 an.

Les tests nécessaires pour réaliser ces contrôles sont décrits dans la section C.4.

2. Méthode de fabrication

Les lots de vaccin sont produits sur des tapis de cellules de TA en culture primaire ou secondaire fraîchement produites. Un échantillon du stock viral lyophilisé est remis en suspension dans du GMEM et inoculé à des tapis de cellules de TA préalablement lavés avec du PBS tiède puis mis à adsorber pendant 15 min à 37°C . La culture est ensuite recouverte de GMEM. L'ECP se manifeste au bout de 4 à 6 jours par une lyse de 50 à 70 % du tapis. La culture est alors congelée-décongelée 3 fois et la suspension obtenue est centrifugée à 600 *g* pendant 20 min. Avant d'être récoltée, la culture doit être examinée afin de détecter un éventuel ECP non spécifique, une opacité du milieu de culture ou un changement du pH traduisant une éventuelle contamination. Un second passage doit être effectué afin d'obtenir une quantité suffisante de virus pour la production d'un lot de vaccin (pour produire 10 millions de doses de vaccin, il est nécessaire d'utiliser 5 flacons de 175 cm²).

Ce procédé est renouvelé autant de fois que nécessaire et les culots cellulaires issus de chaque flacon sont récoltés individuellement et remis en suspension dans un volume égal d'hydrolysate de lactalbumine à 5 %, stérile et réfrigéré, additionné de 10 % de sucrose. Ils sont alors aliquotés en flacons numérotés avant d'être congelés à -20°C . Avant d'être stockés, 0,2 ml de chaque flacon sont prélevés en vue d'un contrôle de stérilité. 0,2 ml sont à nouveau prélevés. Un pool de 2 ml constitué d'échantillons de 0,2 ml chacun issus de 10 flacons est utilisé pour le titrage du virus. Un enregistrement du suivi de toutes les procédures sera conservé pour tous les lots de vaccin.

3. Contrôles en cours de fabrication

Cellules : les cellules doivent provenir de TA en bonne santé issu d'un troupeau indemne de tremblante. Durant leur mise en culture, elles ne doivent pas présenter d'ECP et avoir une morphologie normale (à prédominance fibroblastique). Elles peuvent normalement subir plus d'une dizaine de subcultures. Lorsqu'elles sont utilisées pour la production de vaccin, des cultures témoin non infectées doivent être réalisées en parallèle et maintenues en observation pendant un laps de temps au moins équivalent à la durée d'une subculture supplémentaire. Elles doivent être testées pour rechercher la présence d'une éventuelle souche non cytopathogène du virus de la diarrhée virale bovine ou de la Border disease par la technique d'immunofluorescence ou d'immunoperoxydase. Lorsque cela s'avère possible, les cellules sont préparées et triées avant la production vaccinale, et on en congèle un stock aliquoté (flacons de 1 à 2 ml contenant 20 millions de cellules/ml) dans du DMSO (diméthyle sulfoxyde) stérile en azote liquide. Le sérum utilisé dans le milieu de croissance doit être exempt d'anticorps anti-capripoxvirus et de pestivirus.

Virus : la souche de virus et le vaccin avec lequel il a été préparé doivent être titrés sur des cultures de tissu en tubes ou en microplaques. Bien qu'il suffise de 2 000 DICT₅₀ de virus pour obtenir une protection, il est recommandé que le vaccin soit fabriqué avec une souche de virus sauvage du Kenya ou d'Afrique du sud titrant au moins 3 500 DICT₅₀. Le capripoxvirus est très sensible aux rayons ultraviolets qui l'inactivent et il est nécessaire de tenir compte de ce fait pour éviter une éventuelle perte d'activité sur le terrain. Pour une utilisation chez les bovins sur le terrain du vaccin fabriqué avec la souche roumaine du virus de la variole du mouton, le titre

recommandé est de 2 500 doses infectieuses pour le mouton (DIM₅₀) et la dose de vaccin fabriqué avec la souche roumaine RM65 du virus de la variole du mouton est de 3 000 DICT₅₀ (11).

Des échantillons de vaccin doivent être testés pour la recherche d'éventuels contaminants viraux, en particulier de souches cytopathogènes et non cytopathogènes de pestivirus ; ils doivent être également mélangés avec un immunsérum de capripoxvirus de titre élevé et qui ne contient pas d'anticorps anti-pestivirus, afin de prévenir une éventuelle interférence du virus vaccinal lui-même lors de la réaction. Le vaccin doit être maintenu à -20 °C jusqu'à la fin des titrages et des tests de stérilité, temps au bout duquel il peut être lyophilisé. Un titrage supplémentaire peut être réalisé sur 5 flacons de vaccin lyophilisé prélevés au hasard, afin de confirmer le titre.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et d'absence de contamination à partir de matériel biologique sont décrits au Chapitre I.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité et efficacité

Six bovins sensibles au virus de la DNC sont placés dans une unité de haute sécurité pour grands animaux et du sang leur est prélevé. Cinq flacons de vaccin lyophilisé sont choisis au hasard. On rajoute à chacun du PBS stérile pour les reconstituer et on les mélange. Deux des bovins reçoivent 100 doses de vaccin. Le restant du vaccin est dilué dans du PBS stérile et deux autres bovins sont inoculés par voie sous-cutanée avec la dose vaccinale recommandée. Les deux derniers animaux servent de témoin. Tous les bovins subissent un examen clinique quotidien et leur température rectale est relevée. Le 21^e jour suivant la vaccination, une prise de sang est à nouveau réalisée sur les 6 animaux, à la suite de laquelle ils reçoivent une épreuve virulente d'une souche connue de capripoxvirus par inoculation intradermique. Ils sont ensuite examinés durant les 2 semaines suivantes. Les animaux témoins doivent développer des signes cliniques de DNC, tandis que les bovins vaccinés ne doivent présenter aucune réaction locale ou générale autre qu'une réaction d'hypersensibilité de type retardé qui doit disparaître au bout de 4 jours. Des prélèvements de sérum sont à nouveau effectués le 30^e jour après la vaccination. Les échantillons de sérum prélevés le 21^e jour font l'objet d'une séroneutralisation vis-à-vis de souches virales sélectionnées ayant pu contaminer le vaccin pendant sa préparation, et les sérums prélevés le jour de la vaccination et 1 mois plus tard sont également testés vis-à-vis du pestivirus pour confirmer l'absence d'une éventuelle contamination. Du fait de la variabilité de la réponse des bovins à l'épreuve virulente réalisée avec le virus de la DNC, une maladie généralisée ne doit pas être systématiquement recherchée chez les animaux témoins mais seulement une importante réaction locale.

Le vaccin reconstitué est également testé chez la souris et le cobaye. Deux cobayes reçoivent 0,5 ml de vaccin par voie intramusculaire au niveau de la patte postérieure, tandis que 2 autres cobayes et 6 souris reçoivent respectivement, par voie intrapéritonéale, 0,5 et 0,1 ml de la suspension vaccinale. Deux cobayes et 4 souris sont conservés comme témoins non inoculés. Les animaux sont observés durant 3 semaines, sacrifiés de façon humanitaire et autopsiés. Ils ne doivent pas présenter de pathologie liée au vaccin.

c) Tests d'activité

Chez les bovins, les tests d'activité ayant trait aux souches de capripoxvirus doivent être entrepris lorsque la dose minimum immunisante n'est pas connue. Celle-ci est généralement déterminée par comparaison des titres des épreuves virulentes effectuées sur les flancs d'animaux vaccinés et non vaccinés. À la suite de la vaccination, les flancs d'au moins 3 bovins ayant reçu le vaccin et de 3 témoins sont rasés. Des dilutions logarithmiques de virus d'épreuve sont préparées en PBS stérile et 6 dilutions sont injectées par voie intradermique (0,1 ml par inoculum) sur une ligne horizontale sur le flanc des animaux. Ces injections sont répétées 3 fois avec les mêmes dilutions sur 3 lignes au dessous de la ligne supérieure. Un œdème localisé peut se développer au niveau des 24 points d'inoculation chez les animaux témoins, bien qu'il soit préférable qu'il ne se manifeste qu'une petite réaction ou pas de réaction du tout au niveau des 4 sites où la plus grande dilution de virus a été injectée. Les animaux vaccinés peuvent manifester dans les 24 h après l'injection une réaction d'hypersensibilité qui doit s'atténuer rapidement. Des petites aires de nécrose peuvent se produire au niveau du point d'inoculation du virus le plus concentré. Le titre du virus est évalué tant chez les animaux vaccinés que chez les témoins ; une différence de titre de 2,5 log₁₀ permet de conclure à une bonne protection.

d) Durée de l'immunité

L'immunité conférée par la vaccination avec la souche sauvage kenyane virulente est d'au moins 2 ans, celle conférée par la souche de vaccin sud-africain est de 3 ans, et la protection obtenue à la suite d'une épreuve virulente persiste toute la vie. La durée de l'immunité produite par d'autres souches vaccinales doit

être vérifiée chez les bovins en effectuant des tests de contrôle dans une zone où il n'y a aucune possibilité d'interférence avec d'autres souches sauvages de capripoxvirus.

e) Stabilité

Un vaccin contre la DNC correctement lyophilisé, particulièrement s'il contient un agent protecteur tel que du sucrose ou de l'hydrolysate de lactalbumine, est stable pendant 25 ans s'il est stocké à –20 °C, et 2 à 4 ans lorsqu'il est conservé à 4 °C. Il est évident qu'il est également stable à des températures plus élevées mais aucune expérimentation permettant de le vérifier n'a jusqu'à présent été effectuée.

f) Agents de conservation

Aucun agent conservateur autre qu'une substance protectrice telle que du sucrose ou de l'hydrolysate de lactalbumine n'est requis pour les préparations lyophilisées.

g) Précautions d'emploi et Mise en garde

Aucune précaution spéciale n'est à prendre mis à part celles concernant la stérilité et l'éventuelle contamination par d'autres agents viraux. Le virus de la DNC ne présente aucun risque pour la santé humaine.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Les tests de sécurité doivent être effectués sur chaque lot de vaccin comme décrit dans la section C.4.b.

b) Efficacité

Lorsque l'efficacité d'une souche destinée à être utilisée dans la fabrication d'un vaccin a été déterminée quant à la dose minimum permettant d'engendrer l'immunité, il n'est pas nécessaire de répéter les essais sur chaque lot, à la condition que le titre du virus présent ait été vérifié.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BLACK D.N., HAMMOND J.M. & KITCHING R.P. (1986). Genomic relationship between capripoxviruses. *Virus Res.*, **5**, 277–292.
2. BURDIN M.L. (1959). The use of histopathological examination of skin material for the diagnosis of lumpy skin disease in Kenya. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, **7**, 27–36.
3. CAPSTICK P.B. & COAKLEY W. (1961). Protection of cattle against lumpy skin disease. Trials with a vaccine against Neethling type infection. *Res. Vet. Sci.*, **2**, 362–368.
4. CARN V.M. (1993). Control of capripoxvirus infections. *Vaccine*, **11**, 1275–1279.
5. CARN V.M. (1995). An antigen trapping ELISA for the detection of capripoxvirus in tissue culture supernatant and biopsy samples. *J. Virol. Methods*, **51**, 95–102.
6. CARN V.M. & KITCHING R.P. (1995). An investigation of possible routes of transmission of lumpy skin disease virus (Neethling). *Epidemiol. Infect.*, **114**, 219–226.
7. CARN V.M. & KITCHING, R.P. (1995). The clinical response of cattle following infection with lumpy skin disease (Neethling) virus. *Arch. Virol.*, **140**, 503–513.
8. CARN V.M., KITCHING R.P., HAMMOND J.M., CHAND P., ANDERSON J. & BLACK D.N. (1994). Use of a recombinant antigen in an indirect ELISA for detecting bovine antibody to capripoxvirus. *J. Virol. Methods*, **49**, 285–294.
9. CHIHOTA C., RENNIE L.F., KITCHING R.P. & MELLOR P.S. (2001). Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Epidemiol. Infect.*, **126**, 317–321.
10. COAKLEY W. & CAPSTICK P.B. (1961). Protection of cattle against lumpy skin disease. Factors affecting small scale production of tissue culture propagated virus vaccine. *Res. Vet. Sci.*, **2**, 369–371.

11. COETZER J.A.W. (2004). Lumpy skin disease. *In: Infectious Diseases of Livestock*, Second Edition Coetzer J.A.W. & Justin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, 1268–1276.
12. DAVIES F.G. (1991). Lumpy Skin Disease, a Capripox Virus Infection of Cattle in Africa. FAO, Rome, Italy.
13. DAVIES F.G., KRAUSS H., LUND L.J. & TAYLOR M. (1971). The laboratory diagnosis of lumpy skin disease. *Res. Vet. Sci.*, **12**, 123–127.
14. GERSHON P.D. & BLACK D.N. (1987). Physical characterization of the genome of a cattle isolate of capripoxvirus. *Virology*, **160**, 473–476.
15. GERSHON P.D., KITCHING R.P., HAMMOND J.M. & BLACK D.N. (1989). Poxvirus genetic recombination during natural virus transmission. *J. Gen. Virol.*, **70**, 485–489.
16. HAIG D. (1957). Lumpy skin disease. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, **5**, 421–430.
17. IRELAND D.C. & BINEPAL Y.S. (1998). Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J. Virol. Methods*, **74**, 1–7.
18. IRONS P.C., TUPPURAINEN E.S.M. & VENTER E.H. (2005). Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen. *Theriogenology*, **63**, 1290–1297.
19. KITCHING R.P., BHAT P.P. & BLACK D.N. (1989). The characterization of African strains of capripoxvirus. *Epidemiol. Infect.*, **102**, 335–343.
20. KITCHING R.P., HAMMOND J.M. & BLACK D.N. (1986). Studies on the major precipitating antigen of capripoxvirus. *J. Gen. Virol.*, **70**, 485–489.
21. KITCHING R.P. & SMALE C. (1986). Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Res. Vet. Sci.*, **41**, 425–427.
22. MICHAEL A., SABER M.S., SOOLIMAN S.M., MOUSA A.A., SALAMA S.A., FAYED A.A., NASSAR M.I. & HOUSE J. (1996). Control of lumpy skin disease in Egypt with Romanian sheep pox vaccine. *Assiut. Vet. Med. J.*, **36**, 173–180.
23. PROZESKY L. & BARNARD B.J.H. (1982). A study of the pathology of lumpy skin disease in cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **49**, 167–175.
24. ROMERO C.H., BARRETT T., EVANS S.A., KITCHING R.P., GERSHON P.D., BOSTOCK C. & BLACK D.N. (1993). Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. *Vaccine*, **11**, 737–742.
25. TULMAN E.R., AFONSO C.L., LU Z., ZSAK L. KUTISH G.F. & ROCK D.L. (2001). Genome of Lumpy Skin Disease Virus. *J. Virol.*, **75**, 7122–7130.
26. TUPPURAINEN E.S.M., VENTER E.H. & COETZER J.A.W. (2005). The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **72**, 153–164.
27. WALLACE D.B. & VILJOEN G.J. (2005). Immuno responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine*, **23**, 3061–3067.
28. WEISS K.E. (1968). Lumpy skin disease. *Viol. Monogr.*, **3**, 111–131.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la Dermatose nodulaire contagieuse (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).

CORYZA GANGRENEUX

RÉSUMÉ

Le coryza gangreneux est une maladie aiguë généralisée et habituellement fatale qui affecte de nombreuses espèces d'Artiodactyles. La maladie a été le plus souvent décrite chez des espèces de la sous-famille des Bovinés et de la famille des Cervidés, mais elle est aussi connue chez le porc domestique, la girafe et différentes espèces d'antilopes appartenant à la sous-famille des Tragélaphinés. Le coryza gangreneux se définit par des accumulations caractéristiques de cellules lymphoïdes dans des organes non lymphoïdes, des lésions de vasculite et une hyperplasie des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes. L'agent responsable est l'un ou l'autre des deux gammaherpèsvirus. L'Alcélaphine herpèsvirus 1 (AIHV-1) qui circule chez des gnous infectés de manière inapparente, cause la maladie dans différentes régions d'Afrique et chez un grand nombre d'espèces de ruminants dans les parcs zoologiques au niveau mondial. L'herpèsvirus ovin 2 (Ovine herpèsvirus 2 ou OvHV-2) est prévalent chez toutes les races de moutons domestiques chez qui il entraîne une infection sub-clinique, il est à l'origine de cas de coryza gangreneux dans la plupart des régions du monde. Cette forme de la maladie est également identifiée comme le coryza gangreneux « associé au mouton ». Dans les deux formes de la maladie, les animaux présentant des symptômes cliniques ne sont pas une source d'infection car le virus n'est excrété que par ses hôtes naturels (gnous et moutons respectivement).

Le coryza gangreneux apparaît d'habitude de manière sporadique et n'affecte que peu d'animaux bien que les deux virus, AIHV-1 et OvHV-2, puissent entraîner des épizooties. Il y a une grande variation de sensibilité au coryza gangreneux dû à OvHV-2 depuis des espèces relativement résistantes comme Bos taurus et B. indicus, en passant par le buffle domestique, le bison d'Amérique du Nord et de nombreuses espèces de cervidés aux espèces extrêmement sensibles comme le cerf du Père David et les bautengs. La maladie peut présenter une grande variabilité dans ses manifestations cliniques, depuis une forme aiguë où très peu de signes cliniques sont observés avant la mort jusqu'à des cas plus caractéristiques avec une fièvre élevée, une opacité bilatérale des cornées, des écoulements catarrheux importants des yeux et des naseaux, une nécrose du museau et une érosion de l'épithélium buccal. Des particules infectieuses d'animaux présentant un coryza gangreneux dues à AIHV-1 peuvent être retrouvées uniquement en employant des techniques qui maintiennent viables les cellules hôtes alors que le virus OvHV-2 n'a jamais été isolé d'animaux malades. Le diagnostic est d'habitude porté par l'observation des changements histopathologiques caractéristiques. La détection de l'ADN viral dans les deux formes de la maladie est maintenant une option préférée.

Identification de l'agent pathogène : *AIHV-1 peut être isolé à partir des leucocytes du sang périphérique ou de suspensions cellulaires préparées à partir des nœuds lymphatiques ou de la rate des animaux malades mais la viabilité des cellules doit être préservée durant le traitement de l'échantillon car l'infectiosité du virus ne peut être mise en évidence à partir de cellules mortes. Le virus peut aussi être isolé du gnou, soit à partir des leucocytes du sang périphérique, soit à partir de suspensions cellulaires d'autres organes. La plupart des cellules de ruminants sont probablement sensibles et permettent le développement d'un effet cytopathogène (ECP), cependant les cellules de thyroïdes de bovins sont le plus souvent utilisées pour isoler le virus. Les isolats primaires produisent habituellement des cellules multinucléées à partir desquelles l'antigène viral peut être identifié par immunofluorescence ou par une épreuve immunocytochimique au moyen d'un anti-sérum ou d'anticorps monoclonaux. Le virus OvHV-2 n'a jamais été identifié de façon formelle bien que des lignées de cellules lymphoblastoïdes isolées d'animaux malades contiennent l'ADN spécifique de OvHV-2. Les deux virus ont été transmis expérimentalement aux lapins et aux hamsters, qui développent des lésions caractéristiques du coryza gangreneux.*

L'ADN viral a été détecté dans des échantillons prélevés sur des animaux atteints de coryza gangreneux causé soit par AIHV-1 ou OvHV-2 au moyen d'une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) qui devient la méthode de choix pour le diagnostic de la maladie due à OvHV-2.

Épreuves sérologiques : *les gnous infectés, hôtes naturels de l'AIHV-1, développent de façon constante des anticorps qui peuvent être mis en évidence au moyen d'une grande variété d'épreuves dont la séroneutralisation virale, l'immuno-empreinte (immunoblotting), les tests immuno-enzymatiques (ELISA) et l'immunofluorescence. Cependant la réponse sérologique des animaux malades est limitée, aucun anticorps neutralisant ne se développant, la détection des anticorps ne peut donc utiliser que l'immunofluorescence, un test ELISA ou l'immuno-empreinte. Les anticorps contre OvHV-2 n'ont été détectés qu'en utilisant AIHV-1 comme antigène. Les moutons domestiques ont de manière constante des anticorps qui peuvent être détectés par immunofluorescence, test ELISA ou immuno-empreinte. Alors que les anticorps peuvent souvent être détectés par immunofluorescence et un test ELISA chez des bovins atteints de coryza gangreneux, ces anticorps ne sont pas toujours présents chez des espèces présentant une forme plus aiguë de la maladie comme les cervidés. Un test ELISA de compétition (c-ELISA) semble avoir une sensibilité et une spécificité qui sont égales ou supérieures à celles des autres épreuves. Un test ELISA a également été récemment décrit qui donnait des résultats similaires au c-ELISA.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique :
Aucun vaccin n'a été développé pour cette maladie.

A. INTRODUCTION

Le coryza gangreneux est une maladie généralement mortelle des bovins et de nombreuses autres espèces d'Artiodactyles qui se produit après l'infection par l'alcélaphine herpèsvirus 1 (AIHV-1) ou l'herpèsvirus ovin 2 (OvHV-2). Le gnu (*Connochaetes* spp. de la sous-famille des Alcélapinés) est l'hôte naturel de AIHV-1 et ne montre aucun signe clinique après l'infection. De la même manière, l'infection naturelle du mouton domestique, hôte naturel de OvHV-2, n'est pas associée à quelque signe clinique que ce soit, bien que de grandes doses de virus inoculées à des moutons sensibles puissent entraîner des signes cliniques de coryza gangreneux (11). La maladie causée par AIHV-1 ne se rencontre que dans les régions d'Afrique où les gnous sont présents, et, par ailleurs, dans des parcs zoologiques. Cette maladie a été précédemment identifiée comme coryza gangreneux « associé au gnu ». La forme de la maladie due à OvHV-2 se produit dans le monde où des élevages de moutons sont conduits. Elle a été précédemment décrite comme coryza gangreneux « associé au mouton ». Les deux formes de la maladie peuvent présenter une grande variabilité d'aspects cliniques bien que les modifications histopathologiques caractéristiques soient très semblables dans tous les cas. Ces deux virus appartiennent à un sous-groupe de rhadinovirus des ruminants étroitement apparentés qui touchent trois sous-familles de Bovidés (Alcelaphinae, Hippotraginae et Caprinae) ; il est probable que tous peuvent potentiellement provoquer un coryza gangreneux typique. À de rares occasions, des membres de ce groupe de virus, autres que l'AIHV-1 et l'OvHV-2, ont été identifiés comme responsables de cas de coryza gangreneux.

• Changements cliniques et pathologiques

Les signes cliniques du coryza gangreneux sont très variables, ils vont d'une forme suraiguë à une forme chronique avec en général des manifestations plus nettes dans les cas qui durent plus longtemps. Dans la forme suraiguë, soit aucun signe clinique n'est détecté soit on observe une dépression accompagnée de diarrhée et de dysenterie 12 à 24 h avant la mort. En général, le début des signes est associé avec l'arrivée d'une forte fièvre, d'un larmolement séreux accru et d'un exsudat nasal qui évolue vers un jetage mucopurulent abondant. Les animaux peuvent présenter une anorexie et une chute de la lactation. Une opacité cornéenne bilatérale assez caractéristique se développe progressivement en commençant par la périphérie. Dans certains cas, des lésions cutanées apparaissent (caractérisées par des ulcérations et des exsudations), qui peuvent former des croûtes associées à une nécrose de l'épiderme. Elles sont souvent localisées au périnée, au pis et aux trayons. Une salivation associée avec une hyperémie peut être un signe précoce qui évolue vers des érosions de la langue, du palais, des gencives et d'une manière caractéristique de l'extrémité des papilles buccales. Les nœuds lymphatiques superficiels peuvent être hypertrophiés et les articulations peuvent être enflées.

Des signes nerveux comprenant hyperesthésie, incoordination, nystagmus et poussées de la tête peuvent être présents en l'absence d'autres signes cliniques ou comme une partie d'un syndrome plus large et plus caractéristique.

Il y a une grande variabilité dans la sensibilité à la maladie due à OvHV-2. *Bos taurus* et *B. indicus* sont relativement résistants ; la plupart des espèces de cervidés, les bisons (*Bison bison*) et les buffles domestiques (*Bubalus bubalis*) sont plus sensibles ; les bautengs (*Bos javanicus*) et le cerf du Père David (*Elaphurus davidianus*) sont extrêmement sensibles. Les espèces plus résistantes tendent à développer une infection plus prolongée et à montrer des lésions abondantes alors que chez les espèces plus sensibles, l'évolution de la maladie est plus brève et les signes cliniques moins dramatiques.

Des rapports de plusieurs pays et en particulier de Norvège, ont récemment confirmé que la maladie affecte les porcs domestiques (14). Les symptômes sont très semblables à ceux observés dans la forme aiguë chez les bovins.

Une forme plus légère de la maladie décrite en 1930 a été regardée avec un certain scepticisme car la maladie ne pouvait être confirmée que par des modifications histologiques observées à l'autopsie. Cependant, des études récentes utilisant des méthodes moléculaires et sérologiques semblent confirmer que quelques animaux infectés peuvent guérir après des formes cliniques atténuées et même parfois assez sévères de la maladie (15). Certaines études indiquent qu'un nombre non négligeable d'animaux peut être infecté sans présenter de maladie clinique.

• Pathologie

Les changements pathologiques majeurs reflètent la sévérité des signes cliniques mais ils sont généralement étendus et peuvent concerner la plupart des organes. Des érosions et des hémorragies peuvent être présentes tout le long du tractus gastro-intestinal et, dans les formes plus aiguës de la maladie, ils peuvent être associés avec un contenu intestinal hémorragique. En général les nœuds lymphatiques sont hypertrophiés bien que cette réaction varie selon les nœuds lymphatiques chez un même animal. Les nœuds lymphatiques peuvent souvent être fermes et blancs à la coupe, alors que d'autres, en particulier les nœuds sous-mandibulaires et rétropharyngiens, peuvent être hémorragiques et même nécrotiques. Des accumulations catarrhales, des érosions et la formation d'une membrane diphtérique sont souvent observées dans le tractus respiratoire.

Au niveau du tractus urinaire, des hémorragies ecchymotiques de l'épithélium vésical sont souvent présentes alors que le cortex rénal peut être le siège d'un piqueté blanc en relief de 1 à 5 mm de diamètre parfois entouré d'une fine zone hémorragique.

Les changements histologiques ont constitué la base du diagnostic de confirmation du coryza gangreneux. Ils sont caractérisés par une dégénérescence épithéliale, une vasculite, une hyperplasie et une nécrose des organes lymphoïdes, une accumulation généralisée de cellules lymphoïdes dans les espaces interstitiels des organes non lymphoïdes. Des lésions épithéliales peuvent être présentes sur tous les épithéliums et sont caractérisées par une érosion et une ulcération fréquemment accompagnées d'une infiltration sous-épithéliale ou intra-épithéliale de cellules lymphoïdes, qui peut être associées avec de la vasculite et des hémorragies.

La vasculite est généralement présente et peut-être importante au niveau du cerveau affectant veines, artères, artérioles et veinules. Elle est caractérisée par une infiltration de cellules lymphoïdes dans l'adventice et la média, souvent associée avec une dégénérescence fibrinoïde. La lumière des vaisseaux peut être pavée de cellules lymphoïdes et dans des cas sévères, les atteintes de l'endothélium et les accumulations sous endothéliales de cellules lymphoïdes peuvent conduire à l'occlusion des vaisseaux.

L'hyperplasie des nœuds lymphatiques est caractérisée par l'accroissement de cellules lymphoblastoïdes dans le para cortex, alors que les lésions dégénératives sont généralement associées aux follicules. Les tissus péri-ganglionnaires présentent souvent un œdème avec une inflammation lymphoïde.

L'accumulation interstitielle de cellules lymphoïdes dans les organes non lymphoïdes, en particulier le cortex rénal, l'espace péri-portal du foie est typique et dans le cas du rein peut être très important. Dans le cerveau, il peut y avoir une méningo-encéphalite non suppurative avec des manchons lymphocytaires péri-vasculaires et un accroissement notable du nombre de cellules du liquide céphalo-rachidien.

Les lésions macroscopiques observées sur la cornée sont le reflet d'une infiltration de cellules lymphoïdes qui viennent du limbe et qui progressent de façon centripète, avec œdème et érosion dans les cas les plus avancés. Vasculite, hypopion et iridocyclite peuvent être présents.

Les changements pathologiques du coryza gangreneux, quel que soit l'agent causal impliqué, sont très voisins quel que soit l'agent en cause. Cependant, en dehors des examens histologiques, les méthodes de diagnostic de la maladie due à AIHV-1 et de celle due à OvHV-2 sont très différentes et doivent donc être considérées séparément.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

B1. Alcélaphine herpèsvirus-1 : AIHV-1

Cette forme de maladie se rencontre dans les régions d'élevage bovin de l'est de l'Afrique où les bergers utilisent des zones pâturées par les gnous, et dans le sud de l'Afrique dans les zones où les gnous et les bovins partagent les mêmes pâturages. Cependant la maladie peut atteindre une grande variété d'autres espèces de ruminants dans des parcs zoologiques au niveau mondial et donc en dehors des antilopes des sous-familles des Alcélaphinés et des Hippotraginés. Il est recommandé de considérer tous les ruminants comme sensibles. La plupart des épreuves de laboratoire s'appuient sur un isolat atténué (WC11) qui a été passé de nombreuses fois en laboratoire comme source d'antigène et d'ADN viral (17). La séquence complète d'une souche virulente peu passée sur cellules (C500) est maintenant disponible et servira de base aux études ultérieures de ce virus (4).

1. Identification de l'agent pathogène

- **Animaux cliniquement atteints**

- a) **Isolement**

Le point marquant du coryza gangreneux dû à AIHV-1 est l'absence d'antigène viral détectable ou de lésions cytologiques spécifiques d'herpèsvirus. La confirmation de l'infection repose donc sur l'isolement viral. En général, l'infectiosité est strictement liée aux cellules et l'isolement viral ne peut être obtenu qu'à partir de suspensions cellulaires venant des lymphocytes du sang périphérique, des nœuds lymphatiques ou d'autres tissus infectés. Des suspensions cellulaires contenant environ 5×10^6 cellules par ml, sont préparées dans un milieu pour cultures cellulaires et inoculées sur un tapis cellulaire établi. Les cellules de thyroïde de bovins ont été utilisées de façon très importante, mais la plupart des cellules de ruminants, de première explantation et avec peu de passages, constituent probablement un substrat utilisable pour l'isolement du virus. Après une incubation de 36 à 48 h, le milieu de culture doit être changé et les tapis cellulaires sont examinés au microscope ($\times 40$) pour rechercher un effet cytopathogène (ECP). Cet effet cytopathogène se caractérise par des foyers de cellules multinucléées sur le tapis, qui se rétractent ensuite progressivement formant des corps denses avec des processus cytoplasmiques, qui peuvent se détacher. Cela est suivi de la repousse d'un tapis normal. L'effet cytopathogène peut prendre jusqu'à 21 jours pour se développer. Il est rarement présent avant le 7^e jour. Le pouvoir infectieux à ce stade est largement associé aux cellules, tout passage ultérieur ou tout stockage doit donc employer des techniques qui assurent la viabilité des cellules. La spécificité de l'isolat doit être déterminée au moyen d'un anti-sérum spécifique ou d'anticorps monoclonaux dans des épreuves de fluorescence ou d'immunocytochimie.

- b) **L'ADN viral**

Typiquement, on ne peut détecter que très peu d'ADN viral à partir des tissus infectés, il est donc nécessaire d'amplifier le génome viral, soit au moyen de cultures conventionnelles, soit par amplification en chaîne par polymérase (PCR).

La séquence complète de la souche C500 a été publiée ce qui permet de concevoir des amorces pour les épreuves de PCR à partir des régions conservées du génome. La séquence du gène de la polymérase a été utilisée pour une comparaison phylogénétique du AIHV-1 et des virus apparentés (9).

- **Hôtes naturels**

Il est presque certain que tous les gnous libres sont infectés par AIHV-1 aux environs de l'âge de 6 mois, le virus se propageant de façon épizootique très intense pendant dans la période périnatale. Les espèces *Connochaetes taurinus taurinus*, *C. t. albojubatus* et *C. gnu* sont probablement toutes infectées par le même virus. L'infection semble aussi persister dans la plupart des groupes de gnous entretenus dans des collections zoologiques. Cependant il est possible que l'infection soit absente chez les animaux qui ont été isolés à l'état de veau ou qui vivent en petits groupes. L'infection naturelle a été mise en évidence par hybridation *in situ* sur des coupes de poumons de veau de *C. t. taurinus* en Afrique du Sud (16).

Après l'infection il y a une brève période d'excrétion virale dans une forme non cellulaire et le virus peut alors être isolé à partir d'écouvillonnages nasaux. Au cours de cette période, le virus peut aussi être isolé à partir des leucocytes du sang, mais chez des animaux plus âgés, cet isolement est plus difficile à obtenir à moins que les animaux soient immunodéprimés suite à un stress ou à une intervention pharmacologique. De plus, le virus peut

être isolé à partir de cultures de tissus d'animaux apparemment normaux, et cela a été obtenu sur des tapis de cellules à la fois de rein et de thyroïde d'animaux adultes.

D'autres grandes antilopes des sous familles des Alcélapinés et des Hippotraginés sont aussi infectées par des gammaherpèsvirus antigéniquement étroitement apparentés. Mais il n'y a aucune preuve que ce virus puisse passer à d'autres espèces et causer un coryza gangreneux, excepté mais de manière exceptionnelle dans des populations d'animaux en captivité.

2. Épreuves sérologiques

• Animaux malades

La réponse sérologique des animaux malades est limitée, en particulier aucun anticorps neutralisant n'apparaît. Dans les cas cliniques, les anticorps peuvent être mis en évidence de manière régulière par immunofluorescence ou immunoperoxydase au moyen de cellules infectées par la souche WC11. Une méthode immuno-enzymatique (ELISA) de compétition a pour la première fois été développée pour détecter les anticorps contre OvHV-2 (12) utilisant l'anticorps monoclonal (15-A) correspondant à un épitope qui semble conservé dans tous les virus entraînant un coryza gangreneux ; cette épreuve est vraisemblablement applicable également dans le cas d'animaux infectés par l'AIHV-1.

• Hôtes naturels

Des anticorps apparaissent d'une manière constante chez les gnous après l'infection et ils peuvent être identifiés par des épreuves de séroneutralisation d'extraits acellulaires de WC11 ou par immunofluorescence, encore une fois contre WC11 et en utilisant un conjugué anti IgG bovin, qui croise avec les IgG de gnu. La souche Minnesota du coryza gangreneux, qui ne se distingue pas de la souche WC11 de AIHV-1, est utilisée comme antigène pour l'ELISA de compétition.

Jusqu'à maintenant, il n'y a eu aucune normalisation de l'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) et de l'immunoperoxydase mais les deux méthodes sont données en exemple plus loin dans le texte. Le kit ELISA de compétition est disponible dans le commerce.

a) Épreuve d'immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte est moins spécifique que la séroneutralisation virale ; elle peut être utilisée pour mettre en évidence des antigènes précoces ou tardifs sur des tapis de cellules infectées par AIHV-1. Les anticorps qui réagissent dans les épreuves d'IFI ou d'immunoperoxydase se développent chez des bovins et chez des lapins infectés expérimentalement pendant la période d'incubation et plus tard pendant la phase clinique de la maladie. Des réactions croisées avec d'autres herpèsvirus bovins, comme avec OvHV-2, diminuent la valeur du diagnostic différentiel. La détection de ces anticorps entraînant des réactions croisées peut parfois être utile pour appuyer un diagnostic de coryza gangreneux « associé aux moutons ».

• Préparation des lames fixées

Infecter un tapis cellulaire juste ou presque confluent (voir section B1.2.c) avec du virus AIHV-1 (souche WC11). Des cellules non-infectées doivent être traitées en parallèle comme témoin. Environ 4 jours après l'infection, lorsque les premiers signes d'effet cytopathogène doivent apparaître, mais avant que cet effet soit manifeste, traiter les cellules de la manière suivante : rejeter le milieu, laver avec du PBS, récupérer les cellules avec une solution de trypsine-versène, culotter les cellules à 800 *g* pendant 5 min, éliminer le surnageant et remettre les cellules en suspension dans 10 ml de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) pour chaque flacon de culture de 800 ml.

Contrôler la suspension cellulaire dans deux puits d'une lame multi-puits traitée au polytétrafluoroéthylène ; sécher à l'air et fixer à l'acétone. Colorer les spots avec un sérum de référence positif et un conjugué anti-IgG d'espèce. Examiner les cellules positives et négatives au microscope à fluorescence. Ajuster la suspension cellulaire en ajoutant des cellules non infectées et/ou du PBS de façon à obtenir une concentration qui formera une seule couche de cellules sur la lame avec des cellules positives clairement identifiables sur un fond de cellules négatives.

Répartir la suspension équilibrée de cellules positives et la suspension de cellules négatives sur des lames multi-spots, et sécher à l'air. Fixer à l'acétone pendant 10 min. Rincer, sécher et conserver les lames sur du gel de silice dans un container fermé à -70 °C.

Une procédure alternative qui est plus facile à évaluer est de préparer des tapis de cellules infectées et non infectées dans des tubes de Leighton ou dans des lames multi-chambres. Les tapis cellulaires sont infectés avec 150 à 200 DICT₅₀ de virus (dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire). Les tapis de cellules infectées et non infectées sont fixés à l'acétone et conservés comme précédemment à –70 °C.

- **Protocole**

- i) Réhydrater les lames pendant 5 min dans du PBS, rincer dans de l'eau distillée et sécher à l'air ;
- ii) Diluer les sérums au 1/20 en PBS. Les échantillons qui donnent une coloration de fond importante, peuvent être éprouvés de nouveau à des dilutions supérieures. Déposer chaque échantillon dilué sur un spot infecté et sur un spot témoin négatif. Inclure les sérums témoins positif et négatif à chaque épreuve. D'une manière idéale, l'épreuve devrait être validée par titrage du témoin positif en déterminant son point final de dilution ;
- iii) Incuber à 37 °C pendant 30 min en chambre humide ;
- iv) Eliminer les liquides des lames. Effectuer deux lavages de 5 min en PBS ;
- v) Laver en PBS pendant 1 h sous agitation, puis sécher les lames à l'air ;
- vi) Déposer un conjugué anti-bovin préparé sur lapin et couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine, à sa dilution de travail telle qu'elle a été déterminée au préalable ;
- vii) Incuber 20 min à 37 °C, éliminer le liquide des lames et effectuer deux lavages de 10 min en PBS ;
- viii) Contre colorer au bleu d'Evans (10^{-4}) pendant 30 s puis faire un lavage de 2 min au PBS. Tremper la lame dans de l'eau distillée, sécher et monter dans un mélange PBS/glycérol (50/50) ;
- ix) Examiner au microscope à fluorescence à la recherche de cellules infectées fluorescentes.

b) Épreuve d'immunoperoxydase

Une dilution de cellules de cornet nasal de bovins infectées par AIHV-1 titrant approximativement 10^3 DICT₅₀ est faite dans une suspension de ces mêmes cellules récemment trypsinées. Elle est ensuite répartie dans des tubes de Leighton contenant une lamelle (1,6 ml par tube) ou dans des lames à 4 chambres (1 ml par chambre).

Contrôler la culture de cellules à 4 et 6 jours à la recherche de l'effet cytopathogène et fixer les cellules à l'acétone dès que l'effet cytopathogène apparaît. Retirer les chambres en plastique des lames mais pas les joints avant fixation, et utiliser de l'acétone (par ex. UltiMAR) qui ne dégradera pas le joint. Conserver les lames fixées à –70 °C.

- **Protocole**

- i) Préparer le diluant pour immunopéroxydase (ajouter 21,0 g de NaCl et 0,5 ml de Tween 20 à 1 l de PBS 0,01 M à pH 7,2) et la solution de lavage (ajouter 0,5 ml de Tween 20 à 1 l de PBS 0,01 M à pH 7,2) ;
- ii) Diluer le sérum à éprouver au 1/20 dans le diluant et déposer 150 à 200 µl de cette dilution sur une lamelle ou le tapis cellulaire d'une chambre infectées et fixées ;
- iii) Incuber en chambre humide à 37 °C pendant 30 min ;
- iv) Tremper la lame ou la lamelle 3 fois dans la solution de lavage ;
- v) Déposer 150 à 200 µl de conjugué marqué à la peroxydase (dilué à 1/5 000 dans le diluant) ;
- vi) Incuber en chambre humide 30 min à 37 °C ;
- vii) Tremper 3 fois la lame ou la lamelle dans la solution de lavage ;
- viii) Diluer le substrat AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) dans de l'eau distillée (5 ml d'eau distillée, 2 gouttes de tampon, 2 gouttes de peroxyde d'hydrogène et 3 gouttes d'AEC) et le déposer sur la lamelle ou la lame ;
- ix) Incuber en chambre humide 8 à 10 min à 37 °C ;
- x) Immerger la lamelle dans l'eau distillée, sécher à l'air et monter sur une lame couvre-objet. Les chambres de culture sont lues à sec ;

- xi) Les lames sont lues au microscope en lumière blanche. La présence d'une coloration brune rougeâtre dans le noyau des cellules infectées indique une réaction positive.

c) Séroneutralisation virale

Des épreuves ont été développées pour détecter les anticorps anti-AIHV-1 à la fois chez le réservoir naturel infecté et chez des hôtes indicateurs. La première de ces épreuves est une séroneutralisation virale utilisant la souche WC11. Une autre épreuve utilise un isolat obtenu sur cerf (AIHV-2). AIHV-1 et AIHV-2 ont des épitopes communs et chaque souche peut donc être utilisée indifféremment dans l'épreuve. Cette épreuve est délicate mais peut être réalisée sur microplaques en utilisant des cellules de peu de passages ou des cellules de lignée. La principale application a été l'étude de l'extension et de l'infection naturelle par les gammaherpèsvirus dans la faune sauvage, les espèces captives en zoo et, dans une moindre proportion, dans les populations de moutons. L'épreuve a aussi été utile dans les essais de développement des vaccins qui tous ont eu un succès limité. La séroneutralisation n'a aucune valeur diagnostique chez un animal cliniquement malade puisque aucun anticorps neutralisant ne se développe chez les espèces sensibles à la maladie.

Le stock d'AIHV-1 (souche WC11) est obtenu sur des cultures de cellules de première ou seconde explantation de rein de bovin, de thyroïde bovine, de cellules de testicule de bovin avec peu de passage ou de tout type de cellules permissives. Le virus est stocké en aliquot à -70°C . Le stock est titré pour déterminer la dilution qui donnera 100 DICT₅₀ dans 25 µl dans les conditions de l'épreuve.

- **Protocole**

- i) Décomplémenter le sérum 30 min au bain marie à 56°C .
- ii) Faire une série de dilutions au 1/2 des sérums à éprouver de 1/2 à 1/16 dans des microplaques traitées pour culture cellulaire, 4 puits par dilution et 25 µl par puits. Des témoins positifs et négatifs sont aussi inclus dans l'épreuve. Comme aucun sérum de référence n'est disponible, un témoin interne doit être préparé et titré.
- iii) Ajouter le virus WC11 à une dilution qui correspond à 100 DICT₅₀ dans 25 µl par puits.
- iv) Incuber 1 h à 37°C . Le reste du virus du stock est aussi incubé.
- v) Effectuer un titrage du restant du virus du stock en effectuant 4 dilutions au 1/10, avec 25 µl par puits et au moins 4 puits par dilution.
- vi) Ajouter 50 µl par puits de cellules de rein de bovin (3×10^5 cellules/ml).
- vii) Incuber la plaque dans une étuve à CO₂ à 37°C pendant 7 à 10 jours.
- viii) Lire les plaques au microscope pour rechercher un ECP. Valider l'épreuve en contrôlant le titrage du virus d'épreuve (qui doit donner une valeur de 100 DICT₅₀ dans 25 µl avec une variation possible entre 30 et 300) et les sérums témoins. Le témoin positif doit donner un titre à plus ou moins 0,3 log₁₀ de la moyenne prédéterminée.
- ix) Les résultats des épreuves sur les sérums sont déterminés au moyen de la méthode de Spearman Kärber comme la dilution qui neutralise le virus dans 50 % des puits.
- x) Un sérum négatif ne doit entraîner aucune neutralisation à la plus faible dilution testée (1/2 correspond à une dilution finale de 1/4).

d) Test ELISA de compétition (c-ELISA)

Un test ELISA de compétition a été d'abord développé pour détecter les anticorps anti-OvHV-2 (12) en utilisant un anticorps monoclonal (15-A) dirigé contre un épitope d'un complexe de glycoprotéines qui semble conservé dans tous les virus du coryza gangreneux. L'anticorps monoclonal a été produit contre l'isolat Minnesota du virus, qui ne peut être distingué de la souche WC11 du virus AIHV-1. Ce test a été employé pour détecter des anticorps dans le sérum de ruminants domestiques et sauvages en Amérique du Nord et des anticorps contre les différents virus pathogènes : AIHV-1, AIHV-2, OvHV-2, CpHV-2 et des herpèsvirus d'origine inconnue qui causent un coryza gangreneux chez le cerf à queue blanche, ainsi que contre des virus du groupe du coryza gangreneux qui ne sont pas encore rapportés comme pathogènes comme ceux portés par l'oryx et le bœuf musqué, par exemple. Le test a récemment été modifié pour accroître sa sensibilité (8). Cette modification a été faite pour rendre possible la détection d'anticorps chez des agneaux nouvellement infectés et chez des animaux en phase aiguë de la maladie, qui ne sont parfois pas détectés avec le test précédent. L'ELISA de compétition a l'avantage d'être plus rapide et plus économique que l'immunofluorescence indirecte ou l'immunoperoxydase. Des données de validation supplémentaires seront disponibles au fur et à mesure que ce test sera utilisé dans des laboratoires de plus en plus nombreux de par le monde.

L'ensemble complet des réactifs pour l'ELISA de compétition, y compris les plaques sensibilisées, l'anticorps monoclonal marqué et les sérums témoins, est disponible commercialement. Pour les laboratoires qui souhaitent sensibiliser leurs propres plaques, le protocole suivant est fourni. Les plaques ELISA Immuno 4 (Laboratoire Dynatech, Chantilly, Virginia) sont sensibilisées à 4 °C pendant 18 à 20 h avec 50 µl d'une solution contenant 0,2 µg par puits d'antigène viral du coryza gangreneux semi-purifié (isolat Minnesota ou WC11) dans un tampon carbonate/bicarbonate 50 mM (pH 9,0). Les plaques sensibilisées sont saturées à température ambiante (21 à 25 °C) pendant 2 h avec du PBS 0,05 M contenant 2 % de saccharose, 0,1 M de glycine, 0,5 % de BSA et 0,44 % de NaCl (pH 7,2). Après saturation, les puits sont vidés et les plaques sont ensuite séchées dans un environnement à faible humidité à 37 °C pendant 18 h puis scellées dans des sacs de plastique contenant un desséchant et conservées à 4 °C (10). L'anticorps monoclonal 15-A est conjugué avec de la peroxydase de raifort par VMRD, Inc. en suivant la méthode de référence au periodate.

• **Protocole**

- i) Diluer les témoins positifs et négatifs et les échantillons à tester (sérum ou plasma) à 1/5 dans le tampon de dilution (PBS avec 0,1 % de Tween 20, pH 7,2) ;
- ii) Ajouter 50 µl d'échantillon à éprouver ou de témoin dans la plaque sensibilisée (4 puits pour le témoin négatif, 2 puits pour le témoin positif). Laisser le puits A1 vide pour l'utiliser comme blanc lors de la lecture ;
- iii) Couvrir la plaque de parafilm et incuber 60 min à température ambiante (21 à 25 °C) ;
- iv) En utilisant un flacon de lavage, laver la plaque 3 fois avec le tampon de dilution (PBS + 0,1 % Tween 20, pH 7,2) ;
- v) Préparer le conjugué d'anticorps peroxydase en diluant un volume de conjugué 100 fois concentré dans 99 volumes de tampon de dilution ;
- vi) Ajouter 50 µl du conjugué dilué à chaque puits. Couvrir la plaque de parafilm et incuber 60 min à température ambiante (21 à 25 °C) ;
- vii) Laver la plaque 3 fois dans le tampon de lavage ;
- viii) Ajouter 100 µl de solution substrat (TMB Microwell, BioFX Laboratoires, Maryland) à chaque puits. Incuber 60 min à température ambiante (21 à 25 °C). Ne pas éliminer la solution des puits ;
- ix) Ajouter 100 µl de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,18 M). Ne pas retirer la solution des puits ;
- x) Lire les densités optiques sur un lecteur ELISA à 450 nm ;
- xi) Calcul du pourcentage d'inhibition :

$$100 - \frac{\text{DO moyenne de l'échantillon} \times 100}{\text{DO moyenne du témoin négatif}} = \% \text{ d'inhibition}$$

- xii) Interprétation des résultats : si un échantillon à éprouver a une inhibition supérieure ou égale à 25 %, il est considéré comme positif, si l'échantillon à éprouver montre une inhibition inférieure à 25 %, il est considéré comme négatif.
- xiii) Validation du test : la DO moyenne du témoin négatif doit être comprise entre 0,4 et 2,10. La DO moyenne du témoin positif doit être supérieure à 25 % d'inhibition.

B2. L'herpèsvirus ovin 2 : OvHV-2

Cette forme de la maladie se produit au niveau mondial chez les bovins et d'autres espèces, elle apparaît d'habitude de façon sporadique et affecte seulement un ou quelques animaux. Cependant, il peut arriver que la maladie se déclare sur plusieurs animaux et il semble que ce soit lié avec certains troupeaux de moutons qui continuent de transmettre la maladie pendant plusieurs années. La maladie peut aussi se transmettre et entraîner des pertes importantes au bison d'Amérique du Nord (*Bison bison*), au cerf élaphe (*Cervus elaphus*) et à d'autres espèces de cervidés, aux buffles domestiques (*Bubalus bulalis*) et même beaucoup plus facilement au cerf du Père David (*Elaphurus davidianus*) et aux bantengs (*Bos javanicus*). OvHV-2 est aussi responsable du coryza gangreneux dans différents parcs zoologiques, où la maladie a été signalée chez un grand nombre d'espèces y compris la girafe. La maladie a été signalée chez le porc dans plusieurs pays mais elle est surtout connue en Norvège où des rapports de cas incluant plusieurs animaux sont régulièrement émis.

Le diagnostic basé sur les signes cliniques et sur les lésions macroscopiques ne peut pas être considéré comme fiable car ces signes sont très variables. L'examen histologique de plusieurs tissus de préférence, rein, foie, vessie, épithélium buccal, cornée/conjonctive et cerveau ont été la seule méthode de porter un diagnostic plus

sûr. Cependant, la recherche d'anticorps contre le virus et/ou d'ADN viral peut maintenant être tentée et devient maintenant la méthode de choix.

Il faut souligner que le virus du coryza gangreneux « associé au mouton » ne peut pas être isolé avec confiance et que le soupçon portant sur OvHV-2 se base sur (a) la présence d'anticorps dans les sérums de tous les moutons domestiques qui entraîne une réaction croisée avec AIHV-1 à l'épreuve d'immunofluorescence et en immuno-empreinte (*immunoblotting*) (5) et rien lors des épreuves de séroneutralisation ; (b) l'apparition d'anticorps qui croisent avec AIHV-1 dans l'épreuve d'immunofluorescence indirecte et le c-ELISA chez la plupart des bovins présentant un coryza gangreneux « associé au mouton » et chez tous les hamsters infectés de façon expérimentale ; (c) la détection et le clonage d'ADN à partir des cellules lymphoblastoïdes isolées de cas naturels du coryza gangreneux « associé au mouton » qui s'hybride avec l'ADN d'AIHV-1 mais reste quand même différent ; (d) la détection par PCR des produits d'amplification uniques de l'OvHV-2 dans le sang périphérique et les tissus infectés.

1. Identification de l'agent pathogène

• Animaux cliniquement atteints

Les essais visant à isoler le virus entraînant la maladie à partir de cas cliniques n'ont pas été jusqu'ici couronnés de succès. Cependant plusieurs rapports mentionnent l'isolement de différents agents viraux à partir de cas cliniques sans qu'il y ait un lien causal entre le virus et la maladie ; cet isolement étant certainement fortuit ou dû à une contamination de laboratoire. Cependant des lignées de cellules lymphoblastoïdes ont été entretenues à partir de bovins et de cervidés infectés, certaines d'entre elles transmettant la maladie à des animaux inoculés expérimentalement (18). De telles lignées cellulaires contiennent des séquences virales qui s'hybrident avec des clones de l'ADN d'AIHV-1 (3). Une séquence du virus a été clonée à partir d'une de ces lignées cellulaires qui code une protéine du tégment distincte de AIHV-1. Par la suite, le génome viral a été cloné en totalité et séquencé (5). Des amorces ont été identifiées à partir de cette séquence pour être utilisées en PCR et un protocole sensible a été mis au point avec amplification initiale d'un fragment de 422 paires de bases (pb) puis d'un fragment interne tronqué de 238 pb. Il a été montré que cette épreuve est capable de détecter l'équivalent de 35 génomes viraux et qu'aucun produit n'est amplifié à partir d'AIHV-1 ou à partir d'autres herpèsvirus des bovidés (1). Cette PCR est donc à la fois très spécifique et très sensible pour OvHV-2. Elle a été employée au niveau mondial dans des études de la maladie sur des animaux cliniquement atteints et chez les hôtes naturels. Cette épreuve semble donc robuste et peut être employée pour détecter l'ADN viral dans les leucocytes du sang périphérique d'animaux cliniquement atteints aussi bien que dans des tissus prélevés à l'autopsie ou même dans des échantillons inclus en paraffine. L'utilisation de particules magnétiques pour purifier l'ADN avant son amplification améliore l'épreuve, mais l'évaluation de cette méthode est encore en cours. Une PCR pour OvHV-2 utilisant une méthode fluorescente quantitative a également été décrite et validée en utilisant la PCR semi-nichée (1) comme étalon (*gold standard*) (7) et il est probable qu'elle soit dans l'avenir applicable et de qualité.

Alors que les premières études indiquaient que l'infection chez des animaux sensibles au coryza gangreneux se terminait toujours par la mort, des études prospectives réalisées sur des troupeaux où l'incidence était élevée suggèrent que des animaux peuvent s'infecter sans présenter une maladie clinique. Les facteurs qui prédisposent les animaux à l'infection et à l'apparition des symptômes ne sont pas élucidés, et il est probable qu'il s'agisse d'un ensemble d'interactions complexes entre l'environnement, l'hôte et le virus infectant. Que le polymorphisme de la classe 11a du complexe d'histocompatibilité majeur intervienne dans la résistance du bison américain comme le suggère une étude (19) est intéressant et devrait être plus amplement étudié.

• Réaction d'amplification en chaîne par polymérase

L'extraction de l'ADN à partir de prélèvements cliniques est effectuée selon le protocole décrit dans les kits d'extraction (par ex. le kit d'extraction Qiagen ND easy Tissue). Les réactions d'amplification sont effectuées dans des volumes de 50 µl ne contenant pas plus de 2 µg d'ADN à tester dans 10 mM de Tris HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 0,01 % (v/v) gélatine, 10 % (v/v) diméthyl sulfoxyde (DMSO), 200 µM d'ATP, d'CTP, d'GTP et d'TTP (Pharmacia), 1 µM de chaque amorce et 2 unités d'ADN polymérase Taq avec 50 µl d'huile minérale (Sigma) pour éviter l'évaporation.

Le programme comprend un précycle de 3 min à 99 °C, après quoi le dNTP et le mélange d'enzymes sont ajoutés. Puis, le cycle suivant est répété 25 fois : 20 s à 94 °C, 30 s à 60 °C et 30 s à 72 °C. 2 µl du premier produit d'amplification résultant de l'action des amorces 556/755 sont transférés directement dans un nouveau mélange réactif et amplifié en utilisant la paire d'amorces 556/55 dans des conditions identiques pour un nouvel ensemble de 25 cycles, l'extension finale se fait à 72 °C pendant 5 min.

Les produits d'amplification terminaux (10 µl) sont analysés directement par électrophorèse en gel d'agarose (1,8 %) et fluorescence au bromure d'éthidium. Lors de chaque réaction, un témoin positif et de l'eau distillée sont aussi amplifiés et analysés comme témoins.

• Hôtes naturels

Le mouton domestique est l'hôte naturel de OvHV-2 et il est probable que toutes les populations de mouton soient infectées par le virus sans aucune manifestation clinique. Des travaux sur la dynamique de l'infection au sein de troupeaux de moutons ont cependant donné des résultats contradictoires ; certains travaux suggèrent que les agneaux contractent l'infection dès les premières semaines de la vie, alors que d'autres laissent à penser que l'infection de la plupart des agneaux n'est possible qu'après l'âge de 3 mois et que le virus est excrété entre le 5^e et le 6^e mois (13). Il existe aussi des arguments en faveur d'une éventuelle contamination des agneaux *in utero*, tandis que d'autres travaux suggèrent que la séparation des agneaux de leurs mères au cours de la première semaine permet d'obtenir des animaux indemnes du virus. Il peut, par conséquent, y avoir des variations considérables dans la dynamique d'infection selon les troupeaux. Des preuves circonstanciées de l'apparition de coryza gangreneux chez les espèces sensibles permettent de penser que la principale source de l'infection se situe au niveau des troupeaux de jeunes, mais des recrudescences périodiques de l'infection peuvent survenir chez les moutons de tous âges.

Les facteurs qui prédisposent à l'excrétion du virus et à la transmission à des hôtes sensibles au coryza gangreneux, ne sont pas élucidés.

En plus du mouton domestique, les chèvres domestiques et d'autres membres de la famille des Caprinés présentent des anticorps qui réagissent avec AIHV-1 d'une manière similaire à ce qui se passe avec du sérum de mouton. Ce qui suppose que ces espèces sont infectées avec du virus voisin d'OvHV-2 et que quelques chèvres ont été trouvées positives par PCR spécifique de OvHV-2, bien que leur rôle potentiel dans le coryza gangreneux pourrait être très limité.

2. Épreuves sérologiques

Les anticorps anti-OvHV-2 ont uniquement été détectés en utilisant AIHV-1 comme antigène. Les anticorps anti-AIHV-1 peuvent être détectés dans 70 à 80 % des bovins présentant une forme clinique par immunofluorescence indirecte ou épreuve d'immunoperoxydase, mais peuvent ne pas être présents chez les cervidés ou dans les formes aiguës ou suraiguës de la maladie. Les anticorps sont détectés par immunofluorescence indirecte sur une culture de cellules infectées par AIHV-1. Les lamelles portant un tapis cellulaire avec 10 à 50 % d'effet cytopathogène sont recueillies, lavées et fixées à l'acétone pour être utilisées dans l'épreuve. Les lamelles sont montées sur une lame couvre-objet avec du DPX, la face portant les cellules au dessus ; elles sont ensuite traitées avec du sérum de cheval à 10 % avant la procédure classique d'immunofluorescence indirecte. La procédure d'immunoperoxydase peut être conduite comme pour AIHV-1. Le seul virus de bovin qui présente une réaction croisée avec AIHV-1 est l'herpèsvirus bovin n°4 (BHV-4). Ainsi, le témoin négatif pour cette épreuve pourrait être constitué de cellules infectées par BHV-4. Les sérums ne sont considérés positifs que si les foyers de cellules infectées par AIHV-1 montrent une distribution d'antigènes intranucléaire caractéristique avec une coloration absente ou faible du cytoplasme et si les cellules infectées par BHV-4 ne montrent aucune réaction. Les sérums qui présentent une réaction avec les deux virus sont considérés comme ininterprétables. Un test ELISA de compétition a été développé pour détecter les anticorps anti-OvHV-2 (12) avec un anticorps monoclonal (15-A) dirigé contre l'isolat Minnesota du virus qui ne peut pas être distingué de AIHV-1. L'épreuve a été employée pour rechercher les anticorps dans le sérum de ruminants domestiques et sauvages d'Amérique du Nord et semble présenter quelque intérêt (Section B1.2.d) (10). Dans une étude de la réaction des sérums de moutons aux protéines structurales d'AIHV-1 par immun-empreinte, la réactivité des différents sérums variait de manière frappante, indiquant que chaque individu répondait d'une manière différente à la reconnaissance des épitopes communs à AIHV-1.

B3. Contrôle

Actuellement, les mesures de contrôle reposent sur la séparation des hôtes naturels et des espèces sensibles, l'extension de cette séparation dépendant des espèces considérées. Avec AIHV-1, il apparaît que les animaux atteints de coryza gangreneux ne transmettent jamais ou rarement l'infection, par conséquent, seul l'hôte naturel peut servir de source d'infection. Les gnous semblent transmettre d'une manière efficace l'infection à la plupart des autres ruminants. Il est donc important de les isoler lors de rassemblements de plusieurs espèces. De même, les bergers doivent s'assurer que les bovins sont totalement isolés ou à l'abri de la proximité des gnous et qu'ils ne vont pas dans des pâturages qui ont été utilisées récemment par ces animaux en particulier au moment de la mise-bas des troupeaux de gnous.

Avec OvHV-2, la nécessité d'isoler les moutons des autres espèces dépend de ces espèces. Ainsi, le cerf du Père David et les bautengs doivent être strictement séparés et éviter tout contact même indirect avec les ovins. De la même façon, pour les bisons et les cerfs d'élevage, il est important de séparer la zone d'élevage des cervidés d'une éventuelle zone d'élevage de moutons, bien que le daim (*Dama dama*) semble plus résistant au coryza gangreneux. Les bovins développent rarement un coryza gangreneux « associé au mouton », ils peuvent donc être en général élevés à proximité de moutons sans prendre de précaution contre une possible transmission

de la maladie du mouton au bovin. Cependant si des cas multiples se produisent, il est essentiel de séparer les troupeaux de moutons des bovins. Comme de tels troupeaux peuvent être source d'infection pendant des années, il peut être utile d'envisager l'abattage de ces animaux.

Le virus semble aussi avoir été transporté sur des distances non négligeables ; il n'est donc pas possible de déterminer la distance qui doit séparer les moutons

La possibilité de très longues périodes d'incubation, jusqu'à 9 mois, nécessite une attitude réservée quant aux prédictions et recommandations pour le contrôle de telles épidémies.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Toutes les tentatives pour mettre au point et produire un vaccin efficace contre la maladie due au AIHV-1 se sont soldées par des résultats décevants. Cependant, des essais récents visant à induire des titres élevés en anticorps neutralisants au niveau de la muqueuse nasale de veaux ont donné des résultats encourageants ; les recherches futures devraient se focaliser sur ces résultats.

Comme l'OvHV-2 ne peut pas être cultivé avec succès au laboratoire, aucune mise au point de vaccin n'a été envisagée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BAXTER S.I.F., POW I., BRIDGEN A. & REID H.W. (1993). PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch. Virol.*, **132**, 145–159.
2. BRIDGEN A. (1991). The derivation of a restriction endonuclease map for Alcelaphine herpesvirus-1 DNA. *Arch. Virol.*, **117**, 183–192.
3. BRIDGEN A. & REID H.W. (1991). Derivation of a DNA clone corresponding to the viral agent of sheep-associated malignant catarrhal fever. *Res. Vet. Sci.*, **50**, 38–44.
4. ENSSER A., PFLANZ R. & FLECKSTEIN B. (1997). Primary structure of the alcelaphine herpes virus 1 genome. *J. Virol.*, **71**, 6517–6525.
5. HART J., ACKERMAN M., JAYAWARDANE G., RUSSELL G., HAIG D.M., REID H. & STEWART J.P. (2007). Complete sequence and analysis of the ovine herpesvirus 2 genome. *J. Gen. Virol.*, **88**, 28–39.
6. HERRING A.J., REID H.W., INGLIS N. & POW I. (1989). Immunoblotting analysis of the reaction of wildebeest, sheep and cattle sera with the structural antigens of Alcelaphine herpesvirus-1 (malignant catarrhal fever virus). *Vet. Microbiol.*, **19**, 205–215.
7. HUSSY D., STAUBER N., LEUTENEGGER C.M., RIDER S. & ACKERMAN M. (2001). Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication in sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 123–128.
8. HSU D., SHIH L.N., CASTRO A.E. & ZEE Y.C. (1990). A diagnostic method to detect Alcelaphine herpesvirus-1 of malignant catarrhal fever using the polymerase chain reaction. *Arch. Virol.*, **114**, 259–263.
9. LI H., GAILBREATH K., FLACH E.J., TAUS N.S., COOLEY J., KELLER J., RUSSELL G.C., KNOWLES D.P., HAIG D.M., OAKS J.L., TRAUL D.L. & CRAWFORD T.B. (2005). A novel subgroup of rhadinoviruses in ruminants. *J. Gen. Virol.*, **86**, 3021–3026.
10. LI H., MCGUIRE T.C., MULLER-DOBLIES U.U. & CRAWFORD T.B. (2001). A simpler, more sensitive competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to malignant catarrhal fever virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 361–364.
11. LI H., O'TOOLE D., KIM O., OAKS L. & CRAWFORD T.B. (2005). Malignant catarrhal fever-like disease in sheep after intranasal inoculation with ovine herpesvirus-2. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 171–175.
12. LI H., SHEN D.T., KNOWLES D.P., GORHAM J. & CRAWFORD T. (1994). Competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in sheep and other ruminants to a conserved epitope of malignant catarrhal fever virus. *Clin. Microbiol.*, **32**, 1674–1679.

13. LI H., TAUS N.S., LEWIS G.S., Kim O., Traul D.L. & Crawford T.B. (2004). Shedding of ovine herpesvirus 2 in sheep nasal secretions: the predominant mode for transmission. *J. Clin. Microbiol.*, **42** (12), 5558–5564.
14. LOKEN T., ALEKSANDERSEN M., REID H. & POW I. (1998). Malignant catarrhal fever caused by ovine herpesvirus-2 in pigs in Norway. *Vet. Rec.*, **143**, 464–467.
15. MICHEL A.L. & ASPELING I.A. (1994). Evidence of persistent malignant catarrhal fever infection in a cow, obtained by nucleic acid hybridisation. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **65**, 26–27.
16. MICHEL A.L., VAN DER LUGT J.J., BENGIS R.G. & DE VOS V. (1997). Detection of AHV-1 DNA in lung sections from blue wildebeest (*Connochaetes taurinus*) calves by *in situ* hybridisation. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **64**, 169–172.
17. FLOWRIGHT W., FERRIS R.D. & SCOTT G.R. (1960). Blue wildebeest and the aetiological agent of bovine catarrhal fever. *Nature*, **188**, 1167–1169.
18. REID H.W., BUXTON D., POW I. & FINLAYSON J. (1989). Isolation and characterisation of lymphoblastoid cells from cattle and deer affected with 'sheep-associated' malignant catarrhal fever. *Res. Vet. Sci.*, **47**, 90–96.
19. Traul D.L., Li H., Dasgupta N., O'Toole D., Eldridge J.A., Besser T.E. & Davies C.J. (2007). Resistance to malignant catarrhal fever in American bison (*Bison bison*) is associated with MHC class IIa polymorphisms. *Anim. Genet.*, **38** (2), 141–146.

*
* *

THEILÉRIOSE

RÉSUMÉ

Les parasites du genre Theileria sont transmis par des tiques. Ils touchent les bovins et limitent considérablement le développement de l'élevage dans de vastes régions du Vieux Monde¹. Theileria annulata et T. parva sont les espèces les plus importantes sur le plan économique sont responsables d'une mortalité et de pertes de production. Les mesures de lutte contre la theilériose bovine reposent généralement sur l'utilisation d'acaricides pour détruire les tiques, mais cette méthode n'est pas sans inconvénient. Les acaricides sont onéreux, ils dégradent l'environnement et les résistances qui se sont développées au cours du temps exigent le développement de nouveaux produits. Des méthodes de contrôle de la theilériose plus sûres et plus durables qui combindraient une stratégie de lutte contre les tiques et la vaccination sont nécessaires. Cependant, celles-ci devront être appliquées avec succès à grande échelle dans les zones d'enzootie.

Identification de l'agent pathogène : le diagnostic des différents syndromes dus à ces parasites repose principalement sur les signes cliniques, la connaissance de la répartition de la maladie et des vecteurs, et l'identification des parasites sur frottis sanguins et empreintes de nœuds lymphatiques après coloration de Giemsa. La présence de schizontes multinucléés libres ou intra-cytoplasmiques visibles dans les empreintes de nœuds lymphatiques est un élément diagnostique caractéristique des infections aiguës à T. parva et T. annulata. Les animaux infectés par T. parva présentent les signes suivants : tuméfaction des nœuds lymphatiques, hyperthermie, augmentation progressive du rythme respiratoire, dyspnée et diarrhée occasionnelle. Après la mort des animaux, les lésions se caractérisent par un oedème pulmonaire avec présence d'écume dans la trachée, une tuméfaction de la rate et des nœuds lymphatiques, des hémorragies des organes internes, des érosions de la caillette, la présence de lymphocytes parasités et d'infiltrations lymphoprolifératives dans les tissus viscéraux. Les lésions macroscopiques dues aux schizontes de T. annulata et de T. parva sont analogues et le stade piroplasma peut également être pathogène et provoquer anémie et ictère.

Épreuves sérologiques : l'épreuve diagnostique la plus largement utilisée pour Theileria spp. est le test d'immunofluorescence indirecte. Pour ce test, les antigènes de schizontes et de piroplasmes peuvent être préparés sur lames ou en suspension, et conservés par congélation à des températures inférieures à -20 °C, exception faite des suspensions de piroplasmes qui se conservent à 4 °C. Les sérums à tester sont dilués avec un lysat de lymphocytes bovins et mis à incuber avec l'antigène en suspension ; un conjugué d'immunoglobulines anti-bovin est alors ajouté. En utilisant le test tel que décrit, la fluorescence est spécifique de l'agent causal. L'épreuve d'immunofluorescence indirecte est sensible, assez spécifique et en principe facile à réaliser. Cependant, en raison des problèmes de réactivité croisée entre différentes espèces de Theileria, ce test a ses limites pour les enquêtes sérologiques à grande échelle, notamment dans les zones où la distribution de plusieurs espèces se chevauche. Le test d'immunofluorescence indirecte pour T. parva ne permet pas de distinguer entre différentes populations immunogènes. Les nouveaux tests immuno-enzymatiques (ELISA) indirects, mis au point pour T. parva et T. mutans, avec des antigènes recombinants spécifiques du parasite, se sont révélés plus sensibles et plus spécifiques, et ils ont largement remplacé les tests d'immunofluorescence indirecte précédemment utilisés en Afrique. Des épreuves de diagnostic moléculaire plus récentes, reposant notamment sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) et la « reverse line blot hybridisation », sont des

1 Dans ce chapitre, le terme Nouveau Monde correspond aux Amériques, et le terme Vieux Monde correspond à l'Europe, l'Afrique et l'Asie.

outils puissants pour caractériser les polymorphismes parasitaires, définir la génétique des populations et fournir des données épidémiologiques.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : la production de vaccins fiables d'efficacité connue contre *T. parva* et *T. annulata* constitue un développement récent. Pour *T. annulata*, le vaccin est préparé à partir de lignées cellulaires infectées par des schizontes, isolées chez des bovins et atténuées par des cultures in vitro. Le vaccin contient des cellules infectées par des schizontes et doit rester congelé jusqu'au moment de l'administration. La vaccination contre *T. parva* repose sur une méthode associant contamination et traitement. Les bovins reçoivent ainsi, par inoculation sous-cutanée, une dose de sporozoïtes issus de tiques et, simultanément, une tétracycline d'action prolongée. Ce traitement induit une theilériose discrète ou inapparente, suivie de guérison. Après guérison, les animaux présentent une immunité robuste vis-à-vis d'une épreuve virulente homologue, qui persiste généralement à vie. Une immunisation avec un ou des stock(s) induisant une immunité à large spectre est préférable afin de couvrir un grand éventail de souches de *T. parva* existant sur le terrain. Les animaux vaccinés deviennent généralement porteurs de la population parasitaire utilisée pour l'immunisation. Des précautions doivent être prises lors de la préparation et de la manipulation des vaccins contre *T. parva* pour assurer la sécurité du personnel et éviter la contamination des stablats. Il faut également veiller au risque d'introduction de nouvelles souches dans une zone où elles pourraient s'établir par portage.

A. INTRODUCTION

Theileria est un protozoaire intracellulaire strict qui infecte aussi bien les bovidés sauvages que les bovidés domestiques dans une grande partie du monde (certaines espèces touchent également les petits ruminants). Ce parasite, transmis par des tiques de la famille des Ixodidés, présente un cycle évolutif complexe chez des hôtes vertébrés et invertébrés. Six espèces de *Theileria* touchant les bovins ont été identifiées, dont les plus pathogènes et les plus importantes sur le plan économique sont *T. parva* et *T. annulata*. *Theileria parva* est présent dans 13 pays de l'Afrique subsaharienne, provoquant l'« East Coast fever (ECF) », la maladie de Corridor et la maladie de janvier. *Theileria annulata*, à l'origine de la theilériose tropicale, touche de larges secteurs de la côte méditerranéenne du Nord de l'Afrique et s'étend jusqu'au Nord du Soudan et au Sud de l'Europe. Le Sud-est de l'Europe, le proche et le Moyen-Orient, l'Inde, la Chine et le centre de l'Asie sont également concernés. Les régions d'enzootie de *T. annulata* et *T. parva* ne se recoupent pas. Avec *Theileria taurotragi* et *T. mutans*, les manifestations cliniques sont généralement absentes ou discrètes et *T. velifera* n'est pas pathogène. Ces 3 derniers parasites existent principalement en Afrique, avec une distribution chevauchante, ce qui complique l'épidémiologie de la theilériose chez les bovins. On considère à présent que le groupe parasitaire dénommé « complexe *T. sergenti*/*T. buffeli*/*T. orientalis* » est constitué de deux espèces, *T. sergenti*, qui sévit en Extrême-Orient et *T. buffeli*/*T. orientalis* (mentionné comme *T. buffeli*), qui a une répartition globale (15).

La plupart des populations de *T. parva* induisent le portage chez les bovins guéris de la maladie. Des études utilisant des marqueurs à ADN pour caractériser les souches parasitaires ont montré que les animaux porteurs de *T. parva* sont une source d'infection et que le parasite peut être transmis naturellement sur le terrain par des tiques (R. Bishop, R. Skilton, D. Odongo et S. Morzaria, données non publiées). La sévérité de l'ECF peut varier selon des facteurs tels que la virulence de la souche parasitaire, le taux d'infection des tiques par les sporozoïtes et les caractères génétiques des animaux infectés. Les bovins indigènes se trouvant dans les zones d'enzootie de l'« East Coast fever » présentent souvent une maladie discrète ou une infection infraclinique, tandis que les bovins introduits, qu'ils soient indigènes ou exotiques, développent généralement une forme sévère de la maladie.

La méthode la plus simple et la plus largement utilisée pour la prophylaxie de la theilériose est la lutte chimique contre les tiques par des acaricides. Ces pratiques ne sont toutefois pas toujours efficaces en raison d'un certain nombre de facteurs notamment l'apparition d'une résistance aux acaricides, le prix élevé de ces produits, la mauvaise gestion des mesures de lutte et les transferts illicites de bovins dans nombre de pays. La vaccination utilisant des lignées cellulaires infectées par des schizontes atténués a été largement utilisée pour *T. annulata*, tandis que pour lutter contre les infections à *T. parva*, nombre de pays d'Afrique orientale, centrale et australe associent contamination et traitement en utilisant des sporozoïtes issus de tiques et de la tétracycline.

Des produits anti-infectieux comme la parvaquone, la buparvaquone et l'halofuginone sont utilisés en présence de *T. parva* ou de *T. annulata*. Les traitements avec ces produits n'éliminent pas totalement les parasites et cela peut donc entraîner l'apparition de porteurs chroniques.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Le diagnostic d'une theilériose aiguë repose sur les signes cliniques, la connaissance de la maladie et la distribution des vecteurs, ainsi que sur l'examen de frottis sanguins et d'empreintes de nœuds lymphatiques et d'autres tissus, avec coloration de Giemsa. *Theileria parva* et *T. annulata* sont diagnostiquées par détection de schizontes dans les leucocytes ou de piroplasmes dans les érythrocytes. Le stade piroplasme fait suite au stade schizonte et, pour *T. parva* comme pour *T. annulata*, il est généralement moins pathogène et donc souvent observé en période de convalescence ou dans les cas les moins aigus.

1. Identification de l'agent pathogène (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Des schizontes multinucléés intra-lymphocytaires et extra-cellulaires peuvent être observés dans les empreintes de nœud lymphatique après coloration de Giemsa, et sont un élément diagnostique caractéristique des infections aiguës à *T. parva* et *T. annulata*. Tant les schizontes intracellulaires qu'extracellulaires peuvent être détectés. Les schizontes extracellulaires ont pour origine leur excrétion des cellules parasitées lors de la préparation des empreintes. Les schizontes sont transitoires chez *T. mutans* et dans le groupe *T. sergenti*-*T. buffeli*-*T. orientalis*, où le stade piroplasme peut être pathogène. Les schizontes de *Theileria taurotragi* ne sont pas faciles à déceler dans les frottis sanguins avec coloration de Giemsa. Un voile apparaissant sur le côté du piroplasme peut permettre de différencier *T. velifera*. Les schizontes de *T. mutans*, s'ils sont décelés, se distinguent de ceux de *T. parva* par des particules nucléaires plus grosses, aplaties et irrégulières. Les piroplasmes (stade intra-érythrocytaire) de *T. parva*, *T. annulata* et *T. mutans* sont similaires, mais ceux de *T. annulata* et *T. mutans* sont généralement plus gros et leur division peut être observée. Cependant, pour des raisons pratiques, les schizontes et les piroplasmes des différentes espèces de *Theileria* sont difficiles à différencier dans les frottis avec coloration de Giemsa.

Le schizonte est le stade pathogène de *T. parva* et *T. annulata*. Il provoque une maladie initialement lymphoproliférative puis lymphodestructrice. Les animaux infectés présentent une tuméfaction des nœuds lymphatiques, une hyperthermie, une augmentation progressive du rythme respiratoire, une dyspnée et/ou une diarrhée. Les lésions *post mortem* se traduisent le plus souvent par une tuméfaction des nœuds lymphatiques, une augmentation importante du volume de la rate, un oedème pulmonaire, la présence d'écume dans la trachée, des érosions et ulcérations de la caillette et une entérite avec nécrose des plaques de Peyer. Les tissus lymphoïdes sont tuméfiés lors de la phase initiale de la maladie, puis atrophiés si l'animal survit jusqu'aux stades chroniques. L'examen histologique révèle une infiltration de lymphocytes immatures dans les poumons, les reins, le cerveau, le foie, la rate et les nœuds lymphatiques. Des cellules parasitées par des schizontes peuvent être trouvées dans les empreintes réalisées à partir de tous les tissus. Poumons, rate, reins et nœuds lymphatiques sont ainsi particulièrement utiles pour mettre en évidence les schizontes. Dans les cas plus anciens, on peut observer des foyers d'infiltrations lymphocytaires à type d'infarcissements dans le parenchyme rénal. Chez les animaux qui guérissent, des rechutes peuvent occasionnellement survenir. Un syndrome nerveux appelé « turning sickness » est parfois observé dans les zones enzootiques de *T. parva* ; ce syndrome est attribué à des agrégats intravasculaires et extravasculaires de lymphocytes infectés par des schizontes, qui causent des thromboses et une nécrose ischémique dans le cerveau.

Chez *T. annulata*, les stades schizonte et piroplasme peuvent tous deux être pathogènes. Les schizontes sont rares dans le sang périphérique des animaux en phase aiguë et leur présence dans les frottis de sang est de mauvais pronostic. Cependant, les schizontes peuvent être facilement détectés dans les empreintes de tissus de nœud lymphatique, de rate et de foie obtenus par ponction à l'aide d'une aiguille. Les lésions macroscopiques dues aux schizontes de *T. annulata* et de *T. parva* sont analogues tandis que l'anémie et l'ictère sont des caractéristiques des lésions tant des schizontes que des piroplasmes. Les piroplasmes de la plupart des espèces de *Theileria* peuvent persister pendant plusieurs mois ou plusieurs années chez les animaux guéris. Ils sont décelables par intermittence dans les examens ultérieurs. Des résultats négatifs à l'examen des frottis sanguins au microscope n'excluent cependant pas une infection latente. Une parasitémie récidivante peut être induite avec certaines espèces de *Theileria* par splénectomie. Les piroplasmes sont également observés dans les frottis réalisés *post mortem*, mais les parasites apparaissent rétrécis et leur cytoplasme est à peine visible.

La réponse immunitaire à ces parasites est complexe. L'immunité à médiation cellulaire est la réponse protectrice la plus importante chez *T. parva* et *T. annulata*. Pour *T. parva*, les principales réponses protectrices sont médiées par les lymphocytes T cytotoxiques restreints par les molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité des bovins. Les schizontes de *Theileria annulata* parasitent les macrophages et les lymphocytes B. Les réponses immunes innée et acquise coopèrent pour protéger les bovins contre la theilériose à *T. annulata*. L'infection des macrophages par *T. annulata* active le relargage de cytokines, ce qui démarre une réponse immune et facilite la présentation des antigènes du parasite aux lymphocytes T CD4⁺. Les lymphocytes T CD4⁺ produisent de l'interféron- γ (IFN- γ), qui active les macrophages non-infectés pour la synthèse du facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et de l'oxyde nitreux (NO), qui détruit les cellules infectées par les schizontes et les piroplasmes. Les lymphocytes B produisent un anticorps qui associé avec le NO détruit les mérozoïtes extra-cellulaires et les piroplasmes intra-cellulaires. Toutefois, la surproduction par les

macrophages de cytokines, notamment le TNF- α , entraîne plusieurs des signes cliniques et des lésions pathologiques qui caractérisent la theilériose à *T. annulata* et le pronostic de l'infection dépend de l'équilibre subtil entre les propriétés protectrices et les effets pathologiques du système immunitaire.

2. Épreuves sérologiques

- **Test d'immunofluorescence indirecte (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)**

Le test d'immunofluorescence indirecte est l'épreuve diagnostique la plus largement utilisée pour *Theileria* spp.

- **Préparation de l'antigène de schizontes**

i) Antigène de schizontes sur lames

Les antigènes utilisés pour les tests d'immunofluorescence indirecte sont des schizontes intra-cytoplasmiques obtenus à partir de lignées cellulaires lymphoblastiques infectées pour *T. parva* et de lignées cellulaires de macrophage pour *T. annulata*.

Un volume de 200 ml à 1 litre d'une suspension de cellules infectées par des schizontes de *T. parva* ou *T. annulata*, contenant 10^6 cellules/ml, dont au moins 90 % de cellules infectées, est centrifugé à 200 *g* pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé, et le culot cellulaire est remis en suspension dans 100 ml de tampon PBS refroidi (4 °C), de pH 7,2 à 7,4, puis centrifugé comme précédemment. Cette opération de lavage est répétée à 3 reprises et, après lavage final, le culot cellulaire est remis en suspension dans du tampon PBS (environ 100 ml) pour obtenir une concentration finale de 10^7 cellules/ml.

Des couches minces de la suspension cellulaire sont étalées sur des lames multi-puits² recouvertes de Téflon³ ou sur des lames ordinaires, en utilisant du TEXPEN³ ou du vernis à ongles pour la séparation. Les étalements doivent contenir entre 50 et 80 cellules intactes par champ lorsqu'ils sont examinés avec un grossissement de $\times 40$. Les antigènes sont répartis sur les lames à l'aide d'une pipette multicanal ou d'une pipette de 100 μ l. Après étalement et aspiration immédiate de la suspension de schizontes, il reste dans chaque puits une couche monocellulaire de schizontes. Cette opération est effectuée pour chaque unité jusqu'à épuisement de toute la suspension cellulaire. Cette technique permet d'obtenir environ 600 lames de bonne qualité contenant au total 6 000 dépôts individuels d'antigène. Les lames sont séchées à l'air, fixées à l'acétone pendant 10 min, enveloppées individuellement dans du papier de soie, puis emballées par séries de cinq dans une feuille d'aluminium. Elles sont conservées à l'abri de l'air, dans des récipients en matière plastique hermétiques et étanches, à -20 °C ou à -70 °C. Les antigènes se conservent pendant au moins 1 an à -20 °C et plus longtemps à -70 °C.

ii) Antigène de schizontes en suspension

Un volume de 500 ml de cellules infectées par *T. parva* ou *T. annulata*, contenant 10^6 cellules/ml, est centrifugé à 200 *g* pendant 10 min à 4 °C. Le culot cellulaire obtenu est lavé à deux reprises dans 100 ml de tampon PBS refroidi. La viabilité des cellules est déterminée par un test d'exclusion de colorant, en utilisant de l'éosine ou du bleu trypan. Le résultat doit être supérieur à 90 %. Les cellules sont remises en suspension dans une solution saline froide, à raison de 10^7 /ml. À ce volume, on ajoute goutte à goutte 2 volumes d'une solution de fixation refroidie contenant 80 % d'acétone et 0,1 % de formaldéhyde (0,25 % de formol) dans du PBS, tout en agitant doucement et constamment la suspension cellulaire. La suspension est placée à -20 °C et un délai de fixation de 24 h est respecté. Les cellules fixées sont alors lavées à 3 reprises dans une solution salée refroidie, avant d'être centrifugées à 200 *g* pendant 20 min à 4 °C. Après le dernier lavage, les cellules sont remises en suspension dans une solution saline, à raison de 10^7 /ml. Les cellules fixées sont réparties en fractions aliquotes de 0,5 ml. L'antigène est stable à 4 °C pendant 2 semaines, avec 0,2 % d'azide de sodium ajouté comme conservateur ; il se conserve indéfiniment à -20 °C. Cette méthode peut également être utilisée pour préparer l'antigène de schizontes de *T. taurotragi* (J. Katende, A. Musoke et S. Morzaria, données non publiées).

2 Disponible par exemple auprès de Bellco Glass, Vineland, New Jersey, États-Unis d'Amérique, ou de Glaxo-Wellcome, Royaume-Uni.

3 Disponible auprès de TWmark-tex, Roseland, N.J. 07068, États-Unis d'Amérique.

- **Préparation de l'antigène de piroplasmes**

- i) *Antigène de piroplasmes sur lames*

Le stade piroplasme de *Theileria* spp. ne peut être maintenu en culture ; aussi l'antigène de la forme piroplasme doit-il être préparé à partir de sang d'animaux infectés. Des infections sont provoquées par inoculation sous-cutanée de sporozoïtes chez des bovins, ou en utilisant des tiques infectées par *T. parva*, *T. annulata* ou *T. taurotragi*. L'inoculation de sang d'un bovin en phase aiguë reproduit invariablement une infection par *T. annulata*. La splénectomie de l'animal receveur avant l'inoculation augmente considérablement la parasitémie de piroplasmes dans les érythrocytes. Le pic parasitémique est de courte durée et, si les animaux survivent à la maladie, le pourcentage d'érythrocytes infectés décroît considérablement en quelques jours. Les infections par le groupe parasitaire *T. sergenti*/*T. buffeli*/*T. orientalis*, par *T. mutans* ou *T. velifera* sont généralement induites chez des bovins splénectomisés, soit par inoculation intraveineuse de sang provenant d'un animal porteur ou d'un stablat de sang, soit par application de tiques infectées. Lorsque que le taux sanguin de piroplasmes atteint au moins 10 %, 100 ml de sang infecté sont recueillis au niveau de la veine jugulaire dans un tube Vacutainer contenant de l'héparine ou de l'EDTA (acide éthylènediaminetétra-acétique). Le sang est ensuite mélangé délicatement avec 2 litres de tampon PBS. Le mélange est centrifugé à 500 *g* pendant 10 min à 4 °C ; le plasma et les leucocytes sont éliminés et les érythrocytes sont remis en suspension dans 2 litres de tampon PBS, puis soumis à une nouvelle centrifugation. Il est important d'éliminer la couche leucocytaire après chaque lavage. Cette opération de lavage est répétée à 4 reprises. Après le dernier lavage, une partie aliquote du culot érythrocytaire est utilisée pour réaliser des dilutions au demi dans du tampon PBS, puis une goutte de 5 µl de chaque dilution est placée sur les lames. Les dépôts séchés sont fixés au méthanol, soumis à la coloration de Giemsa, et la concentration d'érythrocytes est vérifiée au microscope optique. La dilution qui donne une seule couche d'érythrocytes étalés uniformément sur le dépôt est alors choisie pour préparer à grande échelle les lames d'antigène de piroplasmes. Environ 10 000 lames d'antigène (100 000 dépôts d'antigène) peuvent être préparées à partir de 100 ml de sang infecté. On laisse sécher les étalements d'antigène à température ambiante avant de les fixer à l'acétone refroidi (4 °C) pendant 10 min. Les étalements fixés peuvent être conservés dans les mêmes conditions et pendant la même durée que les lames d'antigène de schizontes.

- ii) *Antigène de piroplasmes en suspension*

Il existe une autre technique de préparation des antigènes que celle qui vient d'être décrite ; elle a été testée pour *T. parva*. Dans cette méthode, 100 ml de sang d'un animal présentant une forte parasitémie à piroplasmes sont prélevés et préparés comme précédemment ; le volume du culot cellulaire est ajusté à 5 % dans du tampon PBS.

Un volume de cette suspension d'érythrocytes est mélangé à 2 volumes de fixateur sous agitation constante (voir ci-dessus la partie concernant la suspension d'antigène de schizontes). Les cellules sont fixées à -20 °C pendant 24 h. Les cellules fixées sont alors lavées à 3 reprises dans un tampon PBS et centrifugées à 1 000 *g* pendant 30 min. Le culot final est remis en suspension dans du tampon PBS contenant 0,2 % d'azide de sodium, jusqu'à obtention d'un volume égal au volume de sang initial, puis des fractions aliquotes de 0,5 ml sont prélevées.

L'antigène de piroplasme, conservé avec 0,2 % d'azide de sodium, est stable à 4 °C pendant au moins 3 ans.

- **Normalisation de l'antigène**

Les suspensions d'antigène de schizontes ou de piroplasmes sont mélangées dans un mélangeur à rotor puis titrées dans du tampon PBS, en réalisant une série de dilutions au demi, depuis la suspension initiale jusqu'à une dilution de 1:16. La dilution montrant une distribution cellulaire d'environ 50 à 80 cellules infectées par des schizontes ou 150 à 200 érythrocytes infectés par champ microscopique, avec un grossissement de $\times 40$, est retenue comme dilution recommandée pour l'utilisation du lot d'antigène correspondant. Les étalements d'antigène nécessaires aux tests sont préparés sur lames en utilisant cette dilution. Ces étalements d'antigène ainsi que les lames d'antigène congelées (préalablement décongelées) sont testés sur une série de dilutions d'un ensemble de sérums témoins négatifs et de sérums fortement, moyennement et faiblement positifs. Si les sérums témoins positifs présentent les titres attendus et si les sérums témoins négatifs ne produisent aucune fluorescence, l'antigène est utilisé pour les épreuves d'immunofluorescence indirecte utilisées en routine.

Les deux types de préparations d'antigène, c'est-à-dire les étalements fixés à l'acétone et conservés à -20 °C ou à -70 °C, et les suspensions d'antigène fixées, conservées à 4 °C ou à -20 °C, sont utilisés en routine dans de nombreux laboratoires. La sensibilité des deux types d'antigène est comparable. Les laboratoires disposant d'installations appropriées de stockage à basse température et d'un approvisionnement fiable en électricité peuvent utiliser les antigènes sur lames. Ces antigènes ne peuvent cependant être transportés que sur de la glace carbonique ou dans l'azote liquide. Par rapport aux antigènes

sur lame, les antigènes fixés en suspension présentent l'avantage de pouvoir être préparés par une méthode dont la phase initiale est plus simple et plus rapide. Ce type d'antigène peut être conservé en grandes quantités dans un seul récipient dont on peut prélever des fractions aliquotes à la demande pour préparer les étalements frais destinés aux épreuves d'immunofluorescence indirecte. Il ne nécessite donc pas de grandes installations de conservation. Les antigènes fixés en suspension peuvent aussi être conservés à 4 °C et transportés à température ambiante sans perte d'antigénicité.

- **Préparation de lysat lymphocytaire bovin**

Le lysat lymphocytaire est préparé selon la méthode décrite par Goddeeris *et al.* (16) afin d'être utilisé dans les épreuves faisant appel à l'antigène de *T. parva* en suspension. En résumé, un veau de 3 mois est splénectomisé et placé dans un bâtiment protégé des tiques et des glossines. Afin d'exclure toute possibilité de theilériose latente, des frottis sanguins colorés au Giemsa sont examinés chaque jour sur une période de 4 semaines pour rechercher les parasites. L'animal indemne de parasite est sacrifié pour prélever le thymus et tous les nœuds lymphatiques accessibles. Ces tissus sont débités en coupes minces dans un tampon PBS refroidi contenant 0,45 % d'EDTA comme anticoagulant. Les cellules sont dissociées, passées à travers une mousseline pour éliminer les débris, lavées à 3 reprises dans du PBS/EDTA et soumises à une centrifugation à 200 *g* pendant 20 min à 4 °C. Les lymphocytes lavés sont remis en suspension dans du PBS sans EDTA pour obtenir une concentration finale de 5×10^7 cellules/ml. Les cellules sont éclatées par une exposition de 5 min à des ultrasons dans des fractions aliquotes de 100 ml, sur de la glace, en utilisant la sonde 3/8. Le matériel obtenu est centrifugé à 1 000 *g* pendant 30 min à 4 °C, et le surnageant est ajusté à 10 mg de protéines/ml, puis stocké à –20 °C en fractions aliquotes de 4 ml.

- **Protocole**

Avec les antigènes de schizontes ou de piroplasmes sur lames

- Mettre à décongeler les lames d'antigène de schizontes ou de piroplasmes, conservées à –20 °C, pendant 30 min à 4 °C, puis pendant 30 min à température ambiante.
- Inactiver les sérums à tester pendant 30 min au bain-marie à 56 °C.
- Extraire les lames de leur emballage et inscrire les numéros des sérums à tester.
- Réaliser des dilutions au 1/40 et au 1/80 des sérums à tester. Inclure des témoins négatif et positif dans chaque test. Des dilutions complémentaires de deux en deux peuvent être réalisées si l'on désire connaître le titre final.
- Transférer alors 25 µl de ces dilutions sériques sur les lames d'antigène.
- Incuber les lames à température ambiante, en chambre humide pendant 30 min.
- Éliminer les échantillons de sérum des puits d'antigène en lavant les lames à deux reprises dans du PBS pendant 10 min.
- Ajouter dans chaque puits 20 µl d'immunoglobulines anti-bovin conjuguées à de l'isothiocyanate de fluorescéine, à la dilution appropriée (en général, les dilutions recommandées par le fabricant conviennent ; cependant de petits ajustements sont parfois nécessaires). Incorporer du bleu Evans au conjugué à la dilution finale de 1:10 000 pour réaliser une contre-coloration et incuber les lames pendant 30 min à température ambiante, en chambre humide.
- Recommencer l'étape vii et monter avec lamelle dans une goutte de PBS contenant 50 % de glycérol.
- Lire les lames au microscope à fluorescence muni d'un éclairage epi-Koem (lampe à mercure de 100 W), d'un bloc de filtration UV, d'oculaires de $\times 6,3$ et d'un objectif à immersion à huile Phaco FL 40/1.3.

Avec les antigènes de schizontes en suspension

- Décongeler les antigènes à la température ambiante.
- Répartir l'antigène en suspension sur les lames en utilisant une pipette multi-canaux ou de 100 µl. En déposant la suspension sur la lame et en la ré-aspirant immédiatement, il reste une couche unicellulaire de cellules infectées dans chaque puits.
- Laisser les lames sécher à température ambiante ou à 37 °C.
- Diluer les sérums à tester et les sérums témoins au 1/40 dans le lysat de lymphocytes (195 µl de lysat de lymphocytes + 5 µl de sérum).
- Procéder ensuite comme décrit dans les étapes v à x du protocole avec l'antigène sur lame.

Avec les antigènes de piroplasmes en suspension

- i) Disperser les érythrocytes de la suspension d'antigène piroplasme (conservée à 4 °C) en utilisant une seringue et une aiguille fine afin de casser les amas.
- ii) Diluer l'antigène aux dilutions préalablement déterminées (voir préparation de l'antigène piroplasme).
- iii) Laisser les lames sécher à température ambiante ou à 37 °C.
- iv) Procéder comme décrit aux étapes iv et v dans le protocole avec l'antigène schizonte en suspension.

- **Caractéristiques de l'épreuve d'immunofluorescence indirecte**

L'incorporation de bleu Evans donne un bon contraste, permettant une bonne différenciation entre les érythrocytes infectés et non-infectés au microscope à fluorescence. Le montage des lames dans du glycérol à 50 %, à pH 8,0, ralentit l'épuisement de l'isothiocyanate de fluorescéine et permet de photographier la préparation. Une fois préparées, les lames restent stables et peuvent être lues pendant 72 h si elles sont conservées dans l'obscurité à 4 °C.

La sensibilité de l'IFI dépend de la période qui s'est écoulée depuis l'infection. Après une contamination par des sporozoïtes, les anticorps dirigés contre *T. parva* et *T. annulata* commencent à être décelables au bout de 10 à 14 jours avec l'antigène de schizontes, et au bout de 15 à 21 jours avec l'antigène de piroplasmes. Après guérison, les anticorps peuvent persister pendant un laps de temps variable qui dépend de différents facteurs tels que le développement du portage, les traitements anti-infectieux et les réexpositions au parasite. Après guérison de la theilériose à *T. parva* ou à *T. annulata*, les titres en anticorps sont en général élevés et détectables pendant 30 à 60 jours. Les titres en anticorps déclinent progressivement et des titres faibles sont encore détectables 4 à 6 mois après la guérison. Par la suite, les anticorps peuvent ne plus être détectables à la dilution de 1/40, mais ils peuvent persister pendant plus d'un an après une seule inoculation. Dans les régions où l'East coast fever est enzootique, la séroprévalence varie de façon importante selon la régularité et le niveau des réexpositions. Au cours d'une étude épidémiologique sur *T. parva*, la sensibilité diagnostique de l'IFI a été estimée à 55 % au seuil de dilution de 1/40 et à 28 % au seuil de dilution de 1/160. La spécificité du test pour les deux seuils était respectivement de 86 % et 95 % (6).

L'épreuve d'immunofluorescence indirecte est utile pour identifier les troupeaux qui incluent des porteurs de *T. annulata*, mais elle n'est pas toujours suffisamment sensible pour déceler tous les individus infectés. Les antigènes préparés pour les épreuves d'immunofluorescence indirecte, aussi bien à partir de schizontes que de mérozoïtes, n'ont pas permis de déceler les anticorps chez certains animaux présentant une infection manifeste à piroplasmes (11).

Dans les infections à *T. mutans* provoquées par une inoculation de sporozoïtes, les anticorps commencent à être mis en évidence 10 à 15 jours après l'apparition de piroplasmes. De faibles titres sont décelables pendant au moins 12 à 24 mois.

L'épreuve d'immunofluorescence indirecte est très sensible pour la recherche des anticorps quand une espèce seulement de *Theileria* existe. En revanche, si cette épreuve est utilisée pour rechercher les anticorps en présence d'infections mixtes à *Theileria*, sa spécificité doit être soigneusement évaluée. Il existe par exemple des réactions croisées entre *T. annulata* et *T. parva* bien que ces réactions soient 4 à 6 fois plus faibles qu'avec les sérums homologues. Ce phénomène n'a pas d'importance dans la pratique courante puisqu'il n'existe pas de chevauchement entre les maladies. Ces réactions croisées ne semblent pas se produire entre *T. parva* et *T. mutans* ni entre *T. annulata* et *T. mutans*. Il existe une faible réactivité croisée entre *T. parva* et *T. taurotragi*, ce qui entraîne une diminution de la spécificité dans une grande partie de l'Afrique sub-saharienne où les deux infections se chevauchent.

Une série d'anticorps monoclonaux a été produite qui détecte plusieurs épitopes de l'antigène immunodominant polymorphe du stade schizonte de *T. parva*. Cette série d'anticorps monoclonaux peut être utilisée pour déceler, par IFI utilisant des lymphocytes infectés par des schizontes (voir note de bas de page n°2), des différences entre diverses populations de *T. parva* ou entre *T. parva* et d'autres espèces de *Theileria*. Ce test a été utilisé, parmi de nombreux autres existants pour la caractérisation, afin de différencier les divers stocks de *T. parva* et pour les contrôles de qualité en laboratoire lors de la préparation des stabiliats (8).

- **Tests diagnostiques futurs pour la recherche de *Theileria***

L'épreuve d'immunofluorescence indirecte est facile à réaliser et raisonnablement sensible et spécifique pour être utilisée sur le terrain pour le dépistage d'infections par *T. parva* et *T. annulata* soit lors d'expérimentations, soit dans un environnement épidémiologique précis où une seule espèce de *Theileria* est présente. Cependant, en raison des problèmes de réactivité croisée évoqués entre différentes espèces

de *Theileria*, ce test a ses limites pour les enquêtes sérologiques à grande échelle, notamment dans les zones où plusieurs espèces se chevauchent. Il serait nécessaire de disposer de tests plus spécifiques, faciles à interpréter et suffisamment robustes pour être utilisés sur le terrain. Les épreuves sérologiques reposant sur la méthode immuno-enzymatique (ELISA) sont actuellement de plus en plus utilisées pour détecter les anticorps spécifiquement dirigés contre le parasite. La méthode ELISA a été adaptée avec succès à la détection des anticorps dirigés contre *T. annulata* (17). Elle permet de déceler les anticorps sur une période plus longue que l'épreuve d'immunofluorescence indirecte (23, 24). Une méthode ELISA adaptée à *T. mutans* a également été décrite (25). Deux anticorps monoclonaux spécifiques de *T. mutans* ont été utilisés dans la technique ELISA pour détecter les anticorps et les antigènes dans les infections aiguës, subaiguës et chroniques. Cette méthode est plus spécifique et plus sensible que l'épreuve d'immunofluorescence indirecte. Cependant, les tests actuellement les plus utilisés pour *T. parva* et *T. mutans* sont des techniques ELISA indirectes basées sur des antigènes spécifiques du parasite, PIM et p32. Ces tests ont été largement évalués en laboratoire comme sur le terrain et ils sont actuellement employés dans de grandes parties de l'Afrique. Les antigènes utilisés dans ces tests sont exprimés dans *Escherichia coli* en utilisant pGEX comme vecteur d'expression (28, 31). Les produits exprimés sont des protéines de fusion avec la glutathion S transférase et sont directement appliqués sur les plaques ELISA. Ces tests ELISA, dotés d'une meilleure sensibilité (supérieure à 95 %) et d'une meilleure spécificité que les tests d'immunofluorescence indirecte (28, 31), devraient être prochainement commercialisés.

Il existe toute une série de sondes pour déceler toutes les espèces de *Theileria* connues pour infecter les bovins. Ces sondes reposent sur des séquences de gènes codant l'ARN ribosomique (2, 7). Des sondes à ADN spécifiques de *T. parva* (1, 10, 28) et de *T. mutans* (29) ont également été développées. La technologie de l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) permet d'amplifier un million de fois des quantités infimes d'ADN parasitaire, augmentant ainsi considérablement la sensibilité des sondes à ADN (3). Une technique spécifique reposant sur la PCR a été mise au point pour examiner des échantillons de sang total provenant de bovins porteurs de *T. annulata* (13). Une technique de « reverse line blot » (RLB) reposant sur l'hybridation des produits de la PCR avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques, immobilisées sur une membrane, a été récemment introduite pour détecter simultanément différentes espèces de *Theileria* (18). Il est permis d'espérer qu'en associant la technique ELISA, la PCR et les sondes à ADN, nous améliorerons considérablement notre capacité actuelle à identifier les animaux infectés, rendant ainsi possible une surveillance précise des espèces de *Theileria*. L'objectif final serait de développer ces technologies pour le diagnostic de toutes les maladies transmises par des vecteurs.

L'amplification par PCR des gènes p33/34 du complexe *T. sergenti*/*T. buffeli*/*T. orientalis*, suivie d'une analyse par enzyme de restriction permet de différencier *T. sergenti* de *T. buffeli*/*T. orientalis* (26).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

C1. Vaccins préparés sur culture cellulaire pour *Theileria annulata*

La vaccination contre *T. parva* et *T. annulata* a été tentée depuis que les micro-organismes pathogènes ont été identifiés pour la première fois au début du siècle dernier. Le développement de vaccins vivants fiables, d'activité connue, est cependant beaucoup plus récent. Les plus largement utilisés sont les vaccins contre *T. annulata* préparés par culture cellulaire de schizontes et atténuation. Les procédés de fabrication et les essais d'innocuité ont été décrits (14, 19, 35), et le vaccin est largement utilisé dans les pays suivants : Afrique du Nord, Asie centrale, Espagne, Inde, Iran, Israël, Turquie et République populaire de Chine.

Bien que la vaccination contre *T. annulata* avec un vaccin de culture cellulaire soit disponible depuis plus de 30 ans et qu'elle se soit révélée efficace, son utilisation est restée limitée. L'inquiétude soulevée par l'introduction de parasites d'origine vaccinale dans une population de tiques sur le terrain a conduit chaque pays à produire des vaccins à partir des isolats locaux (27). Certaines lignées cellulaires ont perdu leur capacité à se transformer en mérozoïtes érythrocytaires (piroplasmes) une fois inoculées aux bovins et, à une occasion, des nymphes de *Hyalomma* nourries sur des bovins vaccinés ne se sont pas infectées (21). Cependant, dans la plupart des cas, l'absence de différenciation est déterminée par examen au microscope de frottis sanguins de bovins vaccinés. Cette contrainte, la difficulté pour normaliser la composition antigénique des parasites cultivés et la nécessité de maintenir la chaîne du froid lors du transport du vaccin sur le terrain sont les facteurs limitants de la commercialisation du vaccin (27).

1. Gestion des semences

a) Caractéristiques de la semence

Des cultures de cellules de première explantation infectées par *T. annulata* peuvent être établies avec les nœuds lymphatiques, le foie ou la rate, prélevés dans des conditions aseptiques sur un animal mort infecté, après traitement à la trypsine, ou encore avec la couche leucocytaire de sang périphérique hépariné, séparée par gradient de densité (Ficoll Hypaque), ou avec des lymphocytes recueillis par biopsie de nœuds lymphatiques, à l'aide d'une simple seringue en matière plastique (9, 14).

Des cultures de semence sont préparées à partir de lignées cellulaires cryoconservées, isolées chez des bovins et atténuées comme décrit ci-après. Pour la production des vaccins, un maximum de 20 à 30 passages est recommandé à partir de la culture de semence car il existe des incertitudes sur la stabilité immunogène de ces cultures après des passages multiples.

b) Méthode de culture

Les cellules infectées sont initialement mises en culture dans un milieu essentiel minimal d'Eagle (MEM) ou un milieu de Leibovitz L15 enrichi de 20 % de sérum de veau et contenant de la pénicilline (100 unités/ml), de la streptomycine (50 µg/ml) et de la mycostatine (75 unités/ml), dans des flacons de culture tissulaire en matière plastique de 25 ml, à capuchon vissé. On peut également utiliser du milieu RPMI 1640 contenant 10 % de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine, de pénicilline et de streptomycine. Ce milieu est généralement employé avec des cultures établies ; il est renouvelé tous les 3 à 4 jours. L'observation (au microscope à contraste de phase ou au microscope inversé) de cellules brillantes réfractiles, libres dans le milieu de culture, témoigne du développement de cellules infectées. Les cultures peuvent s'établir en monocouche ou en suspension. Le passage est effectué en laissant décanter le milieu, en ajoutant 0,025 % d'EDTA (versène) aux cultures monocouches (sur 15 min), en dispersant les cellules, puis en effectuant les comptages et les prélèvements en fonction de la taille des flacons. Environ 10^6 cellules sont introduites dans un flacon de 25 cm², et le même taux d'ensemencement est utilisé pour les grands flacons, dans un volume de 100 à 200 ml. La technique générale a été décrite par Brown (9).

Le sérum est essentiel au maintien de ces cultures. Il s'obtient à partir de veaux de moins de 6 mois, ou peut être trouvé dans le commerce. Sa toxicité est testée par 3 passages sur une lignée cellulaire établie avant l'utilisation.

c) Atténuation de la virulence

L'atténuation des schizontes de *T. annulata* est obtenue par des mises en culture prolongées avec de nombreux passages (35). La perte de virulence du parasite semble due à un changement dans l'expression des gènes du parasite. L'atténuation est évaluée par inoculation de la culture à des veaux sensibles tous les 20 à 30 passages. Un échantillon de la culture doit être cryoconservé tous les 10 passages pour faire face aux éventuelles pertes ou contaminations accidentelles. L'atténuation est considérée comme complète lorsque les cultures ne provoquent pas d'hyperthermie et ne donnent pas lieu à la présence de schizontes et de piroplasmes décelables chez des veaux sensibles. Une culture atténuée provoque systématiquement une infection chez les bovins, avec réaction sérologique, à 10^5 cellules, sans induire de manifestations cliniques à 10^9 cellules. Les cultures peuvent être cryoconservées en utilisant du diméthylsulfoxyde (DMSO) ou du glycérol. Deux méthodes de conservation et d'administration des vaccins sont décrites plus loin.

2. Méthode de fabrication

Avant de commencer à produire le vaccin, il faut disposer d'une semence aux caractéristiques connues (36). On distingue 3 types de semences :

La semence primaire : il s'agit de cellules infectées par des schizontes, issues d'un nombre de passages déterminé, sélectionnées et conservées indéfiniment, à partir desquelles on effectue tous les passages ultérieurs. La semence primaire doit être constituée d'un lot de semence homogène unique qui a été mélangé et réparti dans des récipients comme un seul lot. Étant donné que des cellules infectées par des schizontes de *T. annulata* sont utilisées dans la procédure de fabrication, la semence primaire est aussi le lot primaire de semence (voir Chapitre 1.1.8., « Principes de production des vaccins vétérinaires »). Pour préparer une semence primaire, on utilise des cellules infectées par des schizontes dont l'innocuité a été contrôlée chez des bovins et on les propage de manière à obtenir en un seul passage en culture environ 5×10^8 cellules. Les cellules sont cryoconservées dans environ 100 cryotubes contenant chacun 5×10^6 cellules. Un contrôle de la viabilité de la semence primaire doit être effectué sur l'un des cryotubes une fois que la semence a été cryoconservée pendant au moins 24 h.

La semence de travail : il s'agit de cellules infectées par des schizontes caractérisés par un nombre de passages situé entre celui de la semence primaire et celui de la semence de production. Pour préparer la semence de travail, le contenu d'un seul cryotube de semence primaire est transféré dans un tube de centrifugation de 10 ml contenant 8 ml de milieu de culture complet. Le tube est centrifugé à 600 g pendant 15 min à 4 °C, puis le culot est transféré dans un flacon de culture de 75 cm² contenant 15 à 20 ml de milieu. Le milieu est remplacé le lendemain et, 4 jours plus tard, les cellules sont dispersées et mises en sous-culture dans des récipients de plus grande taille. Après 5 à 6 sous-cultures supplémentaires, le nombre de cellules infectées est suffisant pour commencer le cycle de fabrication.

La semence de fabrication : il s'agit de cellules infectées par des schizontes, issues d'un nombre spécifique de passages, utilisées sans autre propagation pour préparer un lot de vaccins. La semence de fabrication est obtenue par propagation de grands nombres de cellules par des cultures en monocouche ou en suspension. Les cultures en monocouche sont effectuées dans des flacons de 150 cm² à 175 cm² ; elles permettent généralement d'obtenir en moyenne 7×10^7 à 8×10^7 cellules par flacon. Environ 80 ml de milieu complet sont nécessaires par flacon. Dans un système de culture en flacons roulants, on peut obtenir $1,2$ à $1,5 \times 10^8$ cellules dans une bouteille classique (700 cm²) contenant 100 à 120 ml de milieu. Pour obtenir un rendement cellulaire optimal, les cultures stationnaires et des flacons roulants sont incubés pendant 6 à 7 jours avec un milieu de culture tel que décrit ci-dessus (voir section C1.1.b).

Les cellules infectées par des schizontes sont prélevées dans tous les récipients et réunies afin de calculer leur nombre total. On peut également réensemencer 20 % des cellules pour préparer un autre lot de vaccins. Plusieurs lots de vaccins peuvent être produits en utilisant une partie de la semence de fabrication comme semence de travail. Étant donné qu'une culture prolongée peut provoquer une altération des propriétés futures des schizontes telles que leur pouvoir immunogène, au bout de plusieurs lots de fabrication, on prépare une semence fraîche à partir de la semence primaire pour les lots suivants.

Les cellules infectées par des schizontes sont mélangées avec du DMSO à une concentration finale de 7 %, ou du glycérol à une concentration finale de 10 %, et réparties en fraction aliquotes de 1,8 ml dans des flacons en matière plastique de 2 ml, chaque flacon contenant 10 doses de vaccin concentré. Le temps de répartition du vaccin dans les flacons doit être aussi court que possible puisque le DMSO pénètre immédiatement à travers la membrane cellulaire. Lorsque du glycérol est utilisé, un délai de 30 à 40 min est nécessaire pour atteindre un point d'équilibre avant de congeler le vaccin. Il n'existe pas de consensus sur le nombre approprié de cellules infectées par dose. Une approche pratique recommandée consiste à préparer des doses de 10^6 à 10^7 cellules infectées pour tenir compte de la variabilité des conditions environnementales sur le terrain. Une bonne protection contre les infections dues à des sporozoïtes est néanmoins obtenue par une vaccination avec 10^5 cellules infectées (22).

Le vaccin est congelé en introduisant les flacons dans un congélateur ultrafroid (–70 °C) puis transféré dans des conteneurs d'azote liquide au bout de 24 h. Les flacons peuvent également être introduits dans des vapeurs d'azote liquide pendant 3 h puis immergés dans l'azote liquide pour la conservation (35). Le vaccin est transporté jusqu'au point d'utilisation dans l'azote liquide, puis dilué au 1/10 dans une solution isotonique tamponnée de chlorure de sodium, dans un flacon à capuchon vissé muni d'un opercule en caoutchouc ou en silicone pour permettre un prélèvement aseptique. Pour diluer le vaccin congelé avec du glycérol, la solution isotonique tamponnée de chlorure de sodium doit également contenir 10 % de glycérol pour éviter la destruction des schizontes par choc osmotique. Le vaccin est administré par voie sous-cutanée dans les 30 min suivant sa décongélation (33).

En Iran, le schéma de vaccination prévoit l'inoculation de deux doses de vaccin préparé avec deux stocks différents. Le second stock est administré 30 à 60 jours après l'inoculation du vaccin préparé à partir du premier (19). Au Maroc, on utilise un vaccin issu de cultures fraîches, généralement à une dose 10 fois moindre (10^4 cellules infectées par des schizontes) (22). Les contrôles de qualité des vaccins à courte durée de conservation posent cependant certains problèmes.

- **Précautions pour la sécurité**

Les schizontes de *Theileria annulata* ne présentent aucun risque pour l'homme et ne sont pas contagieux pour les animaux. La principale précaution à prendre dans les bâtiments de production est donc d'éviter la contamination du produit par des organismes contaminants.

3. Contrôles des lots

En Israël, les vaccins préparés avec des schizontes sont contrôlés suivant une procédure documentée (34) avant leur mise sur le marché.

Le vaccin congelé a une durée de conservation pratiquement illimitée. Habituellement, le vaccin à base de schizontes produit en petits lots individuels (3 à 5 000 doses), ce qui rend impraticable le contrôle complet de chacun des lots pour des raisons économiques. Il est par conséquent recommandé de contrôler l'innocuité, l'efficacité, l'activité et la stérilité sur le premier lot produit à partir d'une semence primaire, puis de soumettre chaque lot suivant uniquement à des contrôles de stérilité et d'activité. Cette recommandation repose sur le fait qu'après atténuation des schizontes en culture, aucune réversion vers la virulence n'a jamais été observée lors des cultures ultérieures. Sur le plan de l'efficacité, aucune altération manifeste des propriétés immunogènes n'a été observée lors du nombre limité de passages (20 à 30) nécessaires pour la production du vaccin.

a) Innocuité

Absence de caractéristiques provoquant des réactions locales ou générales indésirables : pour le contrôle de la semence primaire, 2 à 4 veaux sensibles appartenant à la population la plus sensible disponible, une dose 10 fois supérieure à la dose recommandée pour l'immunisation. Cette dose ne doit pas produire de signes cliniques autres qu'une hyperthermie transitoire. Avec une semence primaire totalement atténuée, aucun schizonte et aucun piroplasma ne sera détecté dans les empreintes de nœuds lymphatiques ou de foie, ni dans les frottis sanguins. Cependant, différentes races bovines peuvent présenter des sensibilités diverses au vaccin. Il convient de garder cette réserve à l'esprit lorsqu'un vaccin provenant d'une semence primaire partiellement atténuée doit être administré à des races bovines de grande valeur.

Une fois qu'un test d'innocuité s'est révélé satisfaisant sur un échantillon, tous les lots produits ultérieurement à partir de la même semence primaire peuvent être utilisés sans autre contrôle de l'innocuité. Cependant, si la vaccination sur le terrain entraîne la présence de parasites dans le sang ou les tissus des animaux ou l'apparition de signes cliniques, le lot impliqué ou l'un de ceux qui a été fabriqués à partir de la même semence primaire doit être soumis à un nouveau contrôle d'innocuité.

b) Efficacité

Capacité à protéger contre la theilériose contractée naturellement. Le lot de vaccin expérimental utilisé pour tester l'innocuité peut également être employé pour contrôler l'efficacité du vaccin préparé par culture. Trois à quatre veaux sont vaccinés avec une dose habituelle de vaccin et 6 semaines plus tard, les veaux vaccinés et le même nombre de veaux non vaccinés sont alors contaminés par des sporozoïtes de *T. annulata*. La contamination peut être induite par des tiques adultes vivantes issues de stades préimaginaux infectés avec *T. annulata* ou par inoculation de stabilat préparé à partir de tiques infectées macérées (voir la description des techniques Section C2.1). L'expérience montre que l'inoculation de stabilat (tiques macérées) induit généralement une réponse plus sévère que celle obtenue avec un nombre équivalent de tiques vivantes infectées nourries sur des veaux. Toutefois, à long terme, les résultats issus de l'inoculation de stabilat sont plus reproductibles que ceux obtenus avec différents lots de tiques vivantes.

Il n'existe aucune norme internationalement reconnue pour définir quantitativement la dose d'épreuve nécessaire pour tester l'efficacité des vaccins issus de cultures de *T. annulata*. Des tiques infectées par *Hyalomma* (5 à 10 femelles et autant de mâles) ont été utilisées à jeun pour contaminer les bovins. Un stabilat équivalent à 2-4 tiques macérées, inoculé par voie sous-cutanée dans la région du cou, provoque systématiquement une theilériose aiguë. Les réactions à l'épreuve virulente des veaux vaccinés et des veaux témoins non vaccinés sont surveillées sur la base des paramètres suivants : durée et sévérité de l'hyperthermie, proportion de cellules infectées par des schizontes sur les empreintes de nœuds lymphatiques ou de foie, taux d'érythrocytes infectés par les piroplasmes dans les frottis sanguins, réduction du nombre de leucocytes et d'érythrocytes, et sévérité des manifestations cliniques telles qu'anorexie, dépression et décubitus.

Les résultats du test d'efficacité dépendent de facteurs tels que les caractéristiques immunologiques de la souche de *T. annulata* multipliée et atténuée en culture, la virulence et la dose de la souche de terrain utilisée pour l'épreuve virulente, l'espèce de tiques infectées ayant servi à produire les sporozoïtes. Les données publiées (35) indiquent que les veaux vaccinés avec un vaccin préparé à partir de schizontes puis soumis à une épreuve potentiellement létale, sont apparemment presque totalement protégés ou peuvent présenter une faible parasitémie, s'accompagnant d'une légère hyperthermie et d'une modification non significative des autres paramètres par rapport aux valeurs pré-vaccinales. Une épreuve virulente effectuée avec des parasites provenant de tiques d'une zone géographique éloignée a révélé un moindre degré de protection chez des bovins ayant reçu un vaccin préparé à partir de schizontes. Dans la plupart des essais, les veaux témoins non vaccinés ont présenté en revanche une forte parasitémie et une pancytopenie s'accompagnant de manifestations cliniques sévères. En l'absence de traitement médicamenteux spécifique, la majeure partie des animaux témoins a succombé à l'infection (35). Les résultats obtenus quant à la durée de l'immunité induite par la vaccination avec un vaccin de culture cellulaire sont controversés. Des périodes de moins de 13 mois (32) et de plus de 48 mois (39) ont été avancées.

Des observations sur le terrain ont également permis d'évaluer l'efficacité des vaccins contre la theilériose (34, 39). Des bovins indigènes sensibles ainsi que des races exotiques de grande valeur ont été protégés contre les formes cliniques et mortelles de theilériose dans des pâturages sur lesquels des bovins non vaccinés succombaient à la maladie. Étant donné que les vaccins préparés à partir de schizontes totalement atténués ne donnent pas lieu à l'apparition de piroplasmes, la présence de ce stade chez des bovins vaccinés exempts de signes cliniques est attribuée à une infection inapparente induite par des tiques.

c) **Activité**

Viabilité des cellules infectées par des schizontes. Le contrôle de l'activité est mené par des méthodes quantitatives *in vitro*. Le vaccin congelé reste stable au cours du stockage, même sur des périodes prolongées, mais une certaine perte de viabilité survient lors des phases de congélation et de décongélation. La viabilité doit être testée dans des conditions aussi proches que possible de celles qui règnent sur le terrain. Le vaccin doit par conséquent être décongelé et la suspension diluée de cellules infectées par des schizontes doit être laissée à température ambiante pendant 60 min avant d'effectuer les essais de viabilité. Une technique simple pour évaluer la viabilité des cellules infectées consiste à les compter en utilisant de la nigrosine dans un test d'exclusion de colorant (40). Si après avoir été décongelé, dilué et laissé à température ambiante pendant 1 h, un vaccin contient encore au moins 50 % de cellules vivantes, il peut être accepté pour utilisation même si, dans la plupart des cas, on trouve 80 à 90 % de cellules vivantes.

La viabilité des schizontes est également reflétée par l'aptitude des cellules infectées à se développer en culture sur plaque (40) puisque seules les cellules contenant des schizontes viables se multiplient dans ces conditions. C'est pourquoi le vaccin décongelé et dilué est transféré du flacon à un tube de centrifugation. Un échantillon est prélevé pour le comptage, et la suspension est centrifugée pendant 15 min à 600 *g*. On détermine alors le nombre total de cellules (vivantes et tuées) afin de s'assurer que le vaccin congelé contenait bien la concentration cellulaire initiale nécessaire. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension de manière à atteindre le volume initial, en utilisant un milieu de culture complet. Des dilutions en séries sont effectuées au 1/10 dans un milieu complet, dans des tubes stériles de 10 ml, de telle manière que les deux dernières dilutions contiennent 5×10 et 5 cellules par ml. Douze réplicats de 200 μ l de chacune des deux dernières dilutions sont introduits dans une plaque de culture à 96 puits. Les plaques sont mises à incuber à 37 °C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂ et les cultures sont contrôlées avec un microscope inversé, 6 et 9 jours après l'ensemencement. On compte le nombre de puits contenant en théorie 1 cellule, dans lesquels une croissance est observée. Les vaccins présentant une aptitude à se développer sur plaque inférieure à 2 (cellules) conviennent à une utilisation sur le terrain.

d) **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 ».

e) **Mode d'utilisation**

Le vaccin congelé est conservé dans de l'azote liquide sur le lieu de production et transporté dans les fermes dans de petits caissons isothermes à azote liquide. Dans les zones où la theilériose est enzootique, des centres peuvent être installés sur le terrain pour faciliter le stockage et la livraison du vaccin. L'équipement de base pour l'administration sur le terrain du vaccin congelé comprend un récipient à large col pour la préparation d'un bain-marie à 40 °C, un thermomètre pour mesurer la température de l'eau, de longues pinces, des gants thermo-protecteurs et un masque pour protéger le visage. La première étape lors de l'administration des vaccins aux bovins consiste à revêtir le masque et les gants thermo-protecteurs. Les flacons en quantité nécessaire sont retirés du panier du conteneur d'azote liquide à l'aide des pinces. Lors du retrait des flacons, il importe de maintenir le panier aussi profondément que possible dans le conteneur d'azote liquide afin d'éviter un réchauffement rapide des flacons restants. Chaque flacon retiré doit être contrôlé pour vérifier que de l'azote liquide n'a pas pénétré dedans. L'azote liquide ne modifie pas le vaccin mais risque de faire exploser le flacon quand il est plongé dans l'eau chaude. Les flacons dans lesquels l'azote liquide a pénétré doivent être laissés 1 à 2 min à la température ambiante pour assurer l'évaporation de l'azote liquide avant de continuer la procédure normale. La pénétration d'azote liquide dans les flacons a soulevé la question de la stérilité du vaccin. Cependant, ce système est utilisé depuis des décennies sans aucun problème. Le vaccin est administré par voie sous-cutanée dans les 30 min qui suivent la décongélation (33).

Ces vaccins ne produisent pas d'effets indésirables chez les bovins en bonne santé. Cependant, les animaux présentant des infections pré-existantes, notamment des infections virales, risquent de ne pas bien tolérer la vaccination. L'administration d'un vaccin viral, contre la fièvre aphteuse par exemple, lors de la période d'immunisation (période de réaction) n'est pas recommandée car la réponse immunitaire risque d'en être compromise (19). En Iran, il n'est pas recommandé de vacciner les vaches gravides depuis plus de

5 mois, bien que les études réalisées sur la gestation avec les stocks de vaccins utilisés en Israël n'aient pas révélé d'effets à ce niveau (34). L'immunité engendrée est de longue durée.

En général, les bovins doivent être immunisés lors des premiers mois de la vie et l'exposition aux tiques dans les conditions naturelles renforce leur immunité. Bien que des souches de *T. annulata* différentes sur le plan antigénique aient été identifiées (33), on considère généralement qu'il existe une immunisation croisée suffisante entre les souches pour assurer une protection adéquate contre les expositions parasitaires sur le terrain, cela a notamment été observé en Israël. Dans les grandes zones infectées d'Asie centrale, un stock unique s'est révélé immunologiquement efficace chez 1,5 millions de bovins (12, 40). Toutefois, comme indiqué plus haut, on utilise couramment en Iran deux stocks différents (19).

C2. Immunisation des bovins contre *Theileria parva* par contamination et traitement

La vaccination contre *T. parva* repose sur une méthode associant contamination et traitement. Une fraction aliquote de sporozoïtes viables est inoculée par voie sous-cutanée et les animaux sont traités simultanément par une tétracycline d'action prolongée (37). Les tétracyclines réduisent la sévérité de l'infection qui reste mineure et celle-ci est généralement contrôlée par la réponse immunitaire de l'hôte qui devient porteur du parasite. Il existe toujours des risques liés à l'utilisation de parasites vivants pour l'immunisation. Cependant, des contrôles de qualité corrects associés à un ajustement précis de la dose immunisante, qui doit rester sûre et efficace, permettent d'appliquer cette méthode avec succès sur le terrain. Cette approche a également été utilisée efficacement pour *T. annulata* mais on lui préfère les vaccins préparés à partir de cultures cellulaires (qui conviennent mal à l'immunisation contre *T. parva*). Il est apparu que certains stocks de *T. parva* infectent les bovins systématiquement sans induire de forme clinique, et ceux-ci peuvent donc être utilisés sans traitement à la tétracycline. Un stabilat de ce type est actuellement utilisé sur le terrain. Il présente des avantages considérables par rapport aux stabilats susceptibles d'entraîner des effets mortels et réduit le coût de la vaccination. Certains stabilats de ces stocks peuvent cependant produire une maladie sévère chez les bovins, ce qui souligne l'importance d'un ajustement précis de la dose immunisante.

1. Préparation du stabilat

Afin d'obtenir des résultats cohérents lors des immunisations sur le terrain, il est essentiel de préparer des stabilats de sporozoïtes issus de tiques ayant été infectés en utilisant un stabilat de semence de travail parfaitement caractérisé. Le « stabilat de semence de travail » doit provenir directement du stabilat de semence primaire de référence qui doit être disponible en quantité suffisante pour la préparation future de stabilats immunisants. Des stabilats d'immunisation ont été préparés plus récemment conformément à des normes proposées (30).

L'infection est établie en inoculant le stabilat de semence de travail de *T. parva* à des bovins en bonne santé présentant une réaction sérologique négative vis-à-vis des maladies transmises par les tiques. Lors de la phase parasitémique de la réaction, des nymphes propres de *Rhipicephalus appendiculatus*, élevées en laboratoire, sont mises au contact des animaux et l'on recueille les tiques infectées gorgées de sang. 3 semaines à 4 mois après la mue, les tiques adultes qui en résultent sont ensachées et appliquées sur les oreilles de lapins en bonne santé. Environ 600 tiques sont appliquées à chaque oreille et les tiques non fixées au bout de 24 h sont éliminées. Au bout de 4 jours, les tiques sont retirées et un échantillon (généralement 60 tiques) est prélevé pour déterminer le taux d'infection dans les glandes salivaires disséquées. Les autres tiques sont réparties en lots d'environ 1 000 individus. On peut estimer le nombre total de tiques en comptant et en pesant un nombre connu de tiques, puis en pesant la totalité des insectes. Les tiques sont placées dans une passoire et lavées à grande eau au robinet. Elles peuvent être désinfectées superficiellement avec du chlorure de benzalkonium à 1 % ou dans l'alcool à 70 %, avant d'être à nouveau rincées dans de l'eau distillée.

Les tiques sont placées (environ un millier à la fois) dans des fioles de prélèvement en verre épais ou dans des bechers en matière plastique, dans lesquels on ajoute 50 ml de milieu MEM avec des sels de Hank ou d'Earle et 3,5 % d'albumine de plasma bovin. Les fioles sont conservées sur de la glace et les tiques sont broyées avec un homogénéisateur de tissus (Silverson LR2 par exemple) en utilisant une tête de désintégration à grande ouverture pendant 2 min puis une tête à petite ouverture pendant 3 min (disque émulsionneur). Le broyat de tiques est amené à 50 ml pour 1 000 tiques, puis centrifugé à 50 *g* pendant 5 min, avant le recueil du surnageant. Un volume égal de glycérol froid ajouté à raison de 15 % dans un mélange de milieu MEM et d'albumine de plasma bovin est additionné goutte à goutte au broyat posé sur de la glace et agité à l'aide d'un agitateur magnétique. Le volume final contiendra un nombre de sporozoïtes équivalent à la charge parasitaire de 10 tiques par ml. Le nombre d'équivalents-tiques par millilitre peut être ajusté si le taux d'infection parasitaire d'un lot donné de tiques est très élevé ou très faible. La concentration finale de glycérol dans le stabilat de sporozoïtes est de 7,5 %.

Le broyat de tiques est alors transféré dans des flacons en verre, en utilisant une seringue ou une pipette pour les petits volumes, ou une seringue automatique pour les volumes plus importants. On a également utilisé du

matériel d'insémination artificielle comme celui utilisé pour transférer la semence, avec des paillettes pré-étiquetées en matière plastique. Ce système est idéal pour les stabilats de gros volumes. Les codes couleurs et les étiquetages confèrent une sécurité supplémentaire en permettant l'identification individuelle des stabilats immunisants. Un temps d'équilibrage de 30 à 45 min doit être prévu avant de placer les stabilats de petits volumes au congélateur (-70°C). Une fois congelé, le stabilat peut être transféré pour stockage permanent dans l'azote liquide, en évitant tout risque d'augmentation significative de la température en cours de transfert.

La détermination du nombre d'acini infectés par *T. parva* dans les glandes salivaires des tiques avant qu'elles ne soient broyées est un bon indicateur de l'infection, mais ne tient pas compte de la perte de viabilité due au broyage et à la phase de congélation-décongélation au cours de la préparation du stabilat. En outre, l'état de maturation des sporozoïtes est difficile à estimer par le seul examen histologique des glandes salivaires des tiques. Le pouvoir infectieux du stabilat est, par conséquent, déterminé par inoculation d'une dose standard de 1,0 ml à des bovins sensibles. Les contenus de 2 à 4 tubes sont mélangés et titrés chez les bovins ; le pouvoir infectieux et l'effet létal sont déterminés à différentes dilutions, avant l'utilisation pour l'immunisation. Étant donné que la réponse des bovins à l'infection et au traitement dépend de leur sensibilité, il est important de titrer les stabilats chez des bovins du même type que ceux qui seront immunisés. La sensibilité aux tétracyclines est également vérifiée, essentiellement pour définir une dose contrôlée de stabilat, de préférence en administrant une dose unique de tétracycline à action prolongée en même temps que l'inoculation. La dose immunisante doit induire une infection très discrète ou inapparente (4) ; l'animal doit développer un titre sérologique et être immunisé vis-à-vis d'une épreuve virulente homologue létale. Si l'administration unique de tétracycline ne supprime pas l'infection chez tous les bovins, on a recours soit à une dose plus faible de stabilat immunisant, soit à un second traitement par la tétracycline (jour 0 et jour 4). Une dose unique de 30 mg/kg d'oxytétracycline à action prolongée s'est révélée efficace pour l'immunisation sur le terrain, avec une dilution adaptée de stabilat. Une autre méthode appliquée consiste à établir l'infection par le stabilat et à administrer de la parvaquone à raison de 20 mg/kg au jour 8 (selon le stabilat utilisé). Cette méthode peut s'employer lorsque l'effet des tétracyclines n'est pas constant mais elle requiert plusieurs manipulations des animaux. L'administration unique de buparvaquone à 2,5 mg/kg au moment de la contamination s'est également révélée efficace lorsque l'infection par le stabilat n'était pas contrôlée par l'administration unique de 20 mg/kg de tétracycline à action prolongée.

Une fois établie la procédure d'obtention d'une dose immunisante sûre et efficace, il convient de s'y tenir strictement sur le terrain, sous peine de compromettre la qualité de l'immunisation. Il est également important que la dilution du stabilat et le protocole de traitement (médicament et dose) soient déterminés chez les bovins les plus sensibles, susceptibles de recevoir le vaccin. La méthode de contamination et de traitement repose généralement sur une tétracycline à action prolongée. Il est recommandé d'administrer la tétracycline en premier lieu pour éviter qu'un animal ne s'échappe en ayant reçu uniquement le stabilat.

2. Précautions d'emploi

Lors d'une réunion qui s'est tenue à Malawi en 1988, les participants ont adopté les recommandations ci-après sur les précautions à respecter lors de la préparation, de la manipulation et de l'administration des vaccins associant contamination par *T. parva* et traitement anti-infectieux (4).

a) Recueil des tiques sur le terrain

Il est important d'utiliser des souches de laboratoire bien caractérisées de *Rhipicephalus appendiculatus* pour préparer les stabilats d'immunisation.

Si des tiques sont recueillies sur le terrain à des fins expérimentales, il faut tenir compte des dangers pour l'homme que constituent les agents pathogènes véhiculés par ces insectes. Le principal agent pathogène connu est le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo ; il est généralement associé à des tiques du genre *Hyalomma* et largement prévalent dans la zone de distribution géographique de *R. appendiculatus*. Les personnes chargées de recueillir des tiques sur le terrain doivent, par conséquent, être informées des dangers potentiels liés à cette opération. Les tiques appartenant à des espèces de *Hyalomma* ne doivent généralement pas être retirées des hôtes ; celles qui sont gorgées ou partiellement gorgées de sang ne doivent pas être écrasées entre les doigts. Les tiques qui sont retirées doivent être manipulées avec une pince.

b) Manipulation des tiques

La manipulation au laboratoire des tiques recueillies sur le terrain doit être effectuée dans des conditions contrôlées pour éviter toute piqûre accidentelle du personnel. On nourrit les tiques recueillies sur le terrain sur des lapins et des bovins, dans des locaux isolés. Ces animaux sur lesquels se sont nourries les tiques contaminées en laboratoire ou recueillies sur le terrain doivent être détruits. Une fois que les tiques recueillies sur le terrain se sont gorgées de sang sur des animaux de laboratoire, des parties aliquotes doivent être homogénéisées et testées pour rechercher les autres agents pathogènes pour l'homme par inoculation sur des cellules BHK (rein de jeunes hamsters) et Vero. Les effets de ces inoculations doivent

être étudiés par 3 passages consécutifs. Toutes les tiques non utilisées doivent être détruites par des moyens chimiques ou par incinération.

c) Préparation du stabilat

Lors de la préparation des stabilats de sporozoïtes, il faut veiller à éviter toute contamination du personnel par des agents pathogènes risquant d'être transmis par aérosols au moment du broyage des tiques. Les personnes chargées du broyage doivent être averties des risques potentiels impliqués, et l'accès aux postes d'homogénéisation des tiques doit être limité aux personnes désignées et informées. Le personnel doit porter des vêtements de protection, y compris des gants et un masque, et le broyage doit être effectué sous une hotte de sécurité microbiologique (voir au Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries »).

3. Pureté des stabilats

Les tiques tout comme les mammifères utilisés à titre expérimental sont des sources potentielles de contamination des stabilats par d'autres agents pathogènes. Ainsi, *Ehrlichia bovis*, les espèces de *Borrelia* touchant les bovins, les orbivirus, les bunyavirus et d'autres microorganismes peuvent être des contaminants potentiels. Les tiques recueillies sur le terrain ne doivent par conséquent pas être utilisées pour la préparation des stabilats qui seront utilisés pour l'immunisation. À cet effet, il convient de recourir à des colonies de tiques élevées en laboratoire, bien caractérisées et exemptes d'agents pathogènes. Seuls des bovins et des lapins en bonne santé, indemnes de parasites véhiculés par des tiques, doivent être utilisés pour le nourrissage des tiques. Les stabilats doivent être préparés en conditions aseptiques. Dans certaines circonstances, l'utilisation d'antibiotiques à des concentrations adaptées aux cultures tissulaires peut être indiquée. Les stabilats préparés doivent être soumis à des tests de routine pour vérifier l'absence de toute infection virale par inoculation sur des cellules BHK et Vero (comme ci-dessus). Les stabilats doivent être soumis à une caractérisation de routine *in vivo*, qui doit inclure le contrôle de l'infectivité chez des bovins sensibles intacts, le contrôle de la sensibilité aux tétracyclines et aux autres médicaments contre la theilériose, ainsi que des études d'immunité croisée. Un « stabilat de semence de travail » caractérisé doit être préparé pour vérifier la pureté des populations de *T. parva* dans le stabilat d'immunisation qui en est tiré.

Lors de la préparation du stabilat, il faut également veiller à éviter les contaminations de la population utilisée par d'autres lots de *T. parva*. Les procédures d'assurance qualité doivent être mises en application, entre autres pour la manipulation des tiques infectées. Toutes les règles doivent être strictement respectées. Les postes de manipulation des tiques doivent permettre une séparation rigoureuse des tiques infectées et non infectées. Le personnel chargé de manipuler les tiques doit revêtir une combinaison différente pour chaque lot de tiques utilisé lors de la préparation des stabilats. Les combinaisons doivent être stérilisées chaque jour. Il faut éviter de travailler simultanément sur de multiples populations différentes. Les systèmes de conservation des stabilats doivent inclure un étiquetage clair de chaque tube ou paillette contenant un stabilat.

Les contrôles de qualité sur le stabilat doivent vérifier la similarité avec le stock de semence primaire et déceler également toute contamination étrangère.

4. Risques liés à la vaccination

L'introduction d'un stock de vaccins dans une zone ou un pays dont il n'est pas originaire peut avoir pour conséquence que le parasite (ou un ou plusieurs composants parasitaires du stock) s'établisse par portage chez des bovins et transmission par des tiques. Les effets à long terme de l'introduction de parasites nouveaux (et potentiellement mortels) sur l'épidémiologie de la maladie doivent être considérés avant l'introduction, et doivent être soigneusement surveillés après l'immunisation.

La caractérisation des parasites dans les populations cibles doit être effectuée avant l'immunisation et à plusieurs reprises après celle-ci. À l'heure actuelle, la caractérisation des populations de parasites pour la vaccination repose principalement sur des expériences d'immunisation et de contaminations croisées chez les bovins. Cependant, un certain nombre de méthodes ont été tentées pour caractériser les populations de parasites *in vitro* dans des laboratoires possédant un haut niveau de compétences. Les études préliminaires ont montré que des populations parasitaires qui présentent des profils d'anticorps monoclonaux différents ne confèrent pas nécessairement de protection croisée, contrairement aux populations aux profils similaires (20). Dans des expériences plus récentes utilisant d'autres populations de *T. parva*, cette observation n'a cependant pas été confirmée. Une autre méthode de détection des différences antigéniques a fait appel à des clones de cellules T spécifiques de lignées cellulaires parasitées. Les réponses des cellules T sont en effet considérées comme importantes dans la médiation de l'immunité contre *T. parva* (20). Il n'existe actuellement aucun test *in vitro* qui soit en corrélation avec la protection obtenue *in vivo*. Un indice statistique de pathogénicité, reposant sur des mesures parasitologiques, cliniques et hématologiques, a été proposé pour caractériser les taux d'infectivité et la

virulence de différentes populations de parasites et pour évaluer l'impact des mesures de lutte contre la theilériose (38).

5. Stratégie de vaccination

Contrairement à *T. annulata*, pour lequel on observe une protection croisée importante entre les différentes souches trouvées sur le terrain, la situation est plus complexe pour *T. parva*. Deux stratégies sont utilisées pour tenter de surmonter cette complexité antigénique. Une combinaison de 3 populations, assurant un large spectre de protection, a été testée dans un certain nombre de pays. Un grand volume d'un stabilat trivalent similaire a été préparé pour la FAO par l'International Livestock Research Institute (ILRI) entre 1998 et 2000. Ce dernier stabilat a été préparé conformément aux dernières normes proposées. Il fait la preuve de son innocuité et de son efficacité en Tanzanie. Un lot supplémentaire est en cours de préparation à l'ILRI, du fait de la demande croissante pour la méthode d'immunisation par infection-traitement dans les zones d'Afrique sub-saharienne où *T. parva* est enzootique. Si un stabilat d'immunisation n'assure pas de protection contre une nouvelle population, cette dernière doit être isolée, caractérisée et testée, et l'on doit envisager de l'utiliser seule ou en association avec le stabilat utilisé. Une autre stratégie consiste à préparer des stabilats issus de populations nationales ou locales, en vue de les utiliser dans des zones bien définies. Cette dernière stratégie est plus coûteuse en temps et en ressources mais elle évite dans une certaine mesure l'introduction de nouvelles populations dans une zone. Avec les déplacements de bovins, il existe un risque d'introduction de différentes populations dans une zone, ce qui peut compromettre l'immunité conférée par la population locale. Aussi, l'utilisation de populations locales ou introduites pour l'immunisation doit-elle être soigneusement évaluée.

La méthode de vaccination par contamination et traitement est efficace, sous réserve que soient mises en œuvre les mesures d'assurance qualité voulues. À plus long terme, les problèmes de distribution qui se posent ainsi que le risque de portage et de transmission de la maladie soulignent la nécessité d'identifier des antigènes protecteurs pour la mise au point de vaccins sous-unitaires.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

1. ALLSOPP B.A. & ALLSOPP M.T.E.P. (1988). *Theileria parva*: genomic DNA studies reveal non-specific diversity. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **28**, 77–84.
2. ALLSOPP B.A., BAYLIS H.A., ALLSOPP M.T.E.P., CAVALIER-SMITH T., BISHOP R.P., CARRINGTON D.M., SOHANPAL B. & SPOONER P. (1993). Discrimination between six species of *Theileria* using oligonucleotide probes which detect small subunit ribosomal RNA sequences. *Parasitology*, **107**, 157–165.
3. ALLSOPP B.A., CARRINGTON M., BAYLIS H.A., SOHAL S., DOLAN T.T. & IAMS K. (1989). Improved characterization of *Theileria parva* isolates using the polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **35**, 137–148.
4. ANON (1989). Theileriosis in Eastern, Central and Southern Africa, Dolan T.T., ed. Proceedings of a meeting on East Coast fever immunization held in Malawi, 18–20 September 1988. International Laboratory for Research on Animal Diseases, Nairobi, Kenya, 174–176.
5. ANON (1993). Ticks and Tick-Borne Disease Control, Dolan T.T., ed. Proceedings of a joint OAU, FAO and ILRAD workshop held in Kampala, Uganda, 12–14 September 1991. International Laboratory for Research on Animal Diseases, Nairobi, Kenya, 40.
6. BILLIOUW M., BRAND J., VERCRUYSE J., SPEYBROECK N., MARCOTTY T., MULUMBA M. & BERKENS D. (2005). Evaluation of the indirect fluorescent antibody test as a diagnostic tool for East Coast fever in eastern Zambia. *Vet. Parasitol.*, **127**, 189–198.
7. BISHOP R.P., ALLSOPP B.A., SPOONER P.R., SOHANPAL B.K., MORZARIA S.P. & GOBRIGHT E.I. (1995). *Theileria*: improved species discrimination using oligonucleotides derived from large subunit ribosomal RNA sequences. *Exp. Parasitol.*, **80**, 107–115.
8. BISHOP R.P., SPOONER P.R., KANHAI G.K., KIARIE J., LATIF A.A., HOVE T., MASAKA S. & DOLAN T.T. (1994). Molecular characterization of *Theileria* parasites: application to the epidemiology of theileriosis in Zimbabwe. *Parasitology*, **109**, 573–581.
9. BROWN C.G.D. (1979). Propagation of *Theileria*. In: Practical Tissue Culture Application, Maramorosch K. & Hirumi H., eds. Academic Press, New York, USA, 223–254.

10. CONRAD P.A., IAMS K., BROWN W.C., SOHANPAL B. & OLE-MOIYOI O.K. (1987). DNA probes detect genomic diversity in *Theileria parva* stocks. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **25**, 213–226.
11. DARGHOUGH M.E.A., BOUATTOUT A., BEN-MILED L. & SASSI L. (1996). Diagnosis of *Theileria annulata* – infection of cattle in Tunisia: comparison of serology and blood smears. *Vet. Res.*, **27**, 613–627.
12. DOLAN T.T. (1989). Theileriosis: A comprehensive review. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **8**, 11–36.
13. D'OLIVEIRA C., VANDERMERVE M., HABELA M., JACQUIET P. & JONGEJAN F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2665–2669.
14. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1984). Tick and Tick-borne Disease Control: A Practical Field Manual. FAO, Rome, Italy.
15. FUJISAKI K., KAWAZU S. & KAMIO T. (1994). The taxonomy of the bovine *Theileria* spp. *Parasitol. Today*, **10**, 31–33.
16. GODDEERIS B.M., KATENDE J.M., IRVIN A.D. & CHUMO R.S.C. (1982). Indirect fluorescent antibody test for experimental and epidemiological studies on East Coast fever (*Theileria parva* infection of cattle). Evaluation of a cell culture schizont antigen fixed and stored in suspension. *Res. Vet. Sci.*, **33**, 360–365.
17. GRAY M.A., LUCKINS A.G., RAE P.F. & BROWN C.G.D. (1980). Evaluation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of infections with *Theileria parva* and *Theileria annulata*. *Res. Vet. Sci.*, **29**, 360–366.
18. GUBBELS G., DE VOS A., VAN DER WEILDE M., VISERAS J., SCHOULS L., DEVRIES E. & JONGEJAN F. (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridisation. *J. Clin. Microb.*, **37**, 1782–1789.
19. HASHEMI-FESHARKI R. (1988). Control of *Theileria annulata* in Iran. *Parasitol. Today*, **4**, 36–40.
20. IRVIN A.D. & MORRISON W.I. (1987). Immunopathology, immunology and immunoprophylaxis of *Theileria* infections. In: Immune Response in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis, Soulsby E.J.L. ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 223–274.
21. KACHANI M., EL-HAJ N., KAHOUACHE & OUHELLI H. (2004). Vaccin vivant contre la theileriose bovine constitué par des macroschizonte de *Theileria annulata*: innocuité, durée de l'immunité et absence de portage. *Revue Méd. Vet.*, **155**, 624–631.
22. KACHANI M., EL-HAJ N. & OUHELLI H. (2004). Condition de stockage d'un vaccin vivant contre *Theileria annulata*. *Revue Méd. Vet.*, **155**, 467–471.
23. KACHANI M., FLACH E.J., WILLIAMSON S., OUHELLI H., EL HASNAOUI M. & SPOONER R.L. (1996). The use of an enzyme-linked immunosorbent assay for tropical theileriosis research in Morocco. *Prev. Vet. Med.*, **26**, 329–339.
24. KACHANI M., SPOONER R., RAE P., BELL-SAKYI L. & BROWN D. (1992). Stage-specific responses following infection with *Theileria annulata* as evaluated using ELISA. *Parasitol. Res.*, **78**, 43–47.
25. KATENDE J., GODDEERIS B.M., MORZARIA S.P., NKONGE C.K. & MUSOKE A.J. (1990). Identification of *Theileria mutans*-specific antigen for use in an antibody antigen detection ELISA. *Parasitol. Immunol.*, **12**, 419–433.
26. KAWAZU S., SUGIMOTO C., KAMIO T. & FUJISAKI K. (1992). Analysis of the genes encoding immunodominant piroplasm surface proteins of *Theileria sergenti* and *Theileria bufelli* by nucleotide sequencing and polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **56**, 169–176.
27. MORISSON W.I. & Mc KEEVER D.J. (2006). Current status of vaccine development against *Theileria* parasites. *Parasitology*, **133**, S169–S187.
28. MORZARIA S.P., KATENDE J., MUSOKE A., NENE V., SKILTON R. & BISHOP R. (1999). Development of sero-diagnostic and molecular tools for the control of important tick-borne pathogens of cattle in Africa. *Parasitologia*, **41** (Suppl. 1), 73–80.

29. MORZARIA S.P., MUSOKE A.J., DOLAN T.T., NENE V., NORVAL R.A.I. & BISHOP R. (1989). Studies on pathogenic *Theileria mutans*. Annual Scientific Report, International Laboratory for Research on Animal Diseases, Nairobi, Kenya, 7–8.
30. MORZARIA S., SPOONER P., BISHOP R. & MWAURA S. (1999). The preparation of a composite stabilate for immunisation against East Coast fever. In: Live Vaccines for *Theileria parva*: Deployment in Eastern, Central and Southern Africa. Proceedings of a Joint OAU, FAO and ILRI Workshop held at ILRI, Nairobi, Kenya 10–12 March 1997. ILRI, Kenya, 56–61.
31. MUSOKE A.J., KATENDE J.M., TOYE P.G., SKILTON R.A., IAMS K.P., NENE V. & MORZARIA S.P. (1994). Progress towards development of an antibody detection ELISA for the diagnosis of *Theileria parva*. In: Use of Applicable Biotechnology Methods for Diagnosing Haemoparasites. Proceeding of the Expert Consultation, FAO, Rome, Italy, 174–181.
32. OUELLI H., KACHANI M., EL-HAJ N. & RAISS S. (2004). Vaccin vivant contre *Theileria annulata* et durée de l'immunité. *Revue Méd. Vet.* **155**, 472–475.
33. PIPANO E. (1977). Basic principles of *Theileria annulata* control. In: Theileriosis, Henson J.B. & Campbell M., eds. International Development Research Centre, Ottawa, Canada, 55–65.
34. PIPANO E. (1989). Bovine theileriosis in Israel. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **8**, 79–87.
35. PIPANO E. (1989). Vaccination against *Theileria annulata* theileriosis. In: Veterinary Protozoan and Hemoparasitic Vaccines, Wright I.G., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 203–234.
36. PIPANO E. (1997). Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Trop. Anim. Health Prod.*, **29**, 86S–90S.
37. RADLEY D.E. (1981). Infection and treatment immunization against theileriosis. In: Advances in the Control of Theileriosis, Irvin A.D., Cunningham M.P. & Young A.S., eds. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, The Netherlands, 227–237.
38. ROWLANDS G.J., MUSOKE A.J., MORZARIA S.P., NAGDA S.M., BALLINGAL K.T. & MCKEEVER D.J. (2000). A statistically derived index for classifying East Coast fever reactions in cattle challenged with *Theileria parva* under experimental conditions. *Parasitology*, **120**, 371–381.
39. STEPANOVA N.I. & ZABLOTSKII V.T. (1989). Bovine theileriosis in the USSR. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **8**, 89–92.
40. WATHANGA J.M., JONES T.W. & BROWN C.G.D. (1986). Cryopreservation of *Theileria* infected lymphoblastoid cells with functional assessment of viability. *Trop. Anim. Health Prod.*, **18**, 191–197.

*
* *

TRICHOMONOSE¹

RÉSUMÉ

*La trichomonose génitale bovine est due à *Tritrichomonas foetus*, un protozoaire flagellé parasite. Elle est connue dans le monde entier et a présenté, autrefois, une importance économique majeure comme cause d'avortement et d'infertilité, en particulier en élevage bovin laitier. L'usage répandu de l'insémination artificielle dans plusieurs régions du monde a contribué à réduire la prévalence de la maladie. La trichomonose est cependant encore élevée dans les troupeaux où l'insémination artificielle n'est pas utilisée.*

La transmission de la maladie a lieu essentiellement lors du coït, mais une transmission mécanique par les instruments d'insémination ou au cours de l'examen gynécologique peut avoir lieu. Le parasite peut survivre dans le sperme total ou dilué, conservé à 5 °C. Les taureaux sont les réservoirs principaux de la maladie dans le sens où ils tendent à être porteurs à long terme, alors que beaucoup de vaches éliminent l'infection spontanément. Pour ces raisons, les prélèvements sur taureaux sont utilisés de préférence pour le diagnostic et le contrôle de la maladie dans les troupeaux.

Identification de l'agent pathogène : *Tritrichomonas foetus est un flagellé, protozoaire piriforme parasite, de 8 à 18 µm de longueur et 4 à 9 µm de largeur approximativement, avec 3 flagelles antérieurs et un flagelle postérieur, bordant une membrane ondulante. Les organismes se déplacent avec un mouvement saccadé et onduleux. Ils sont visibles dans des épreuves sur culture d'échantillon préputial de taureau infecté et dans les lavages vaginaux ou le mucus cervico-vaginal de vache infectée, ou parfois dans les fœtus avortés. Tritrichomonas foetus peut être cultivé in vitro, et peut être vu sur une lame sertie humide ou colorée. La méthode de diagnostic de référence pour les taureaux associe la récolte, l'examen et la mise en culture appropriés de smegma du prépuce et du pénis. Le smegma peut être prélevé par des méthodes variées incluant le lavage préputial ou le raclage de la cavité préputiale et du gland du pénis au niveau du fornix avec une pipette à insémination sèche. Un certain nombre de milieux de culture in vitro existent qui peuvent être préparés au laboratoire, mais une épreuve de culture sur le terrain disponible dans le commerce permettant la croissance des trichomonas et l'examen microscopique direct est largement utilisée dans certaines parties du monde.*

Épreuves de substitution : *la trichomonose bovine peut aussi être détectée par amplification par réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR). Dans le passé, une épreuve d'agglutination utilisant du mucus prélevé au niveau du col utérin et un antigène préparé à partir d'organismes de culture ont été utilisés comme épreuve sur troupeau. De même, une épreuve intradermique utilisant un précipité d'acide trichloracétique du parasite a été utilisée dans les troupeaux.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *un vaccin à partir de cellules entières tuées partiellement efficace est disponible commercialement soit sous forme monovalente, soit faisant partie d'un vaccin polyvalent contenant Campylobacter et Leptospira³.*

1 Nomenclature des maladies parasitaires: voir la note dans le chapitre 2.4.18., « Trypanosomoses (transmises par la mouche tsé-tsé) ».

2 InPouch™ TF Test, BioMed Diagnostics, White City, Oregon, États-Unis d'Amérique.

3 Trich Guard ou Trich Guard V5-L, Fort Dodge Laboratories, Fort Dodge, Iowa, États-Unis d'Amérique.

A. INTRODUCTION

La trichomonose génitale bovine est causée par un protozoaire flagellé parasite, *Tritrichomonas foetus*. Les hôtes naturels de *T. foetus* sont les bovidés (*Bos taurus*, *B. indicus*). Des espèces non-pathogènes de trichomonas se rencontrent dans l'intestin des bovins ; *T. suis* du porc est morphologiquement, sérologiquement et, par les analyses moléculaires modernes, génétiquement semblable à *T. foetus* (15, 49). Une caractérisation génétique complémentaire est indispensable pour déterminer le statut taxonomique des souches isolées de bovins ou de porcs.

Tritrichomonas foetus est pyriforme, de 8 à 18 µm de longueur et de 4 à 9 µm de largeur, avec 3 flagelles antérieurs et un postérieur, ainsi qu'une membrane ondulante. Les parasites vivants se déplacent avec un mouvement saccadé, ondulant, et peuvent être détectés au microscope optique. La microscopie en contraste de phase en lumière noire ou d'autres méthodes doivent être utilisées pour observer les détails nécessaires à son identification. Des descriptions morphologiques détaillées, incluant des études en microscopie électronique, ont été publiées par Warton et Honigberg (52). Il est important de différencier *T. foetus* des autres protozoaires flagellés contaminants qui pourraient être présents dans des échantillons de l'appareil reproducteur des bovins (4, 7, 38, 50). En contraste de phase, le nombre de flagelles observés est une caractéristique importante qui peut aider à différencier *T. foetus* de certains flagellés de bovins qui peuvent apparaître semblables. Une technique par coloration a été décrite qui peut être utilisée pour observer plus clairement la morphologie et faciliter l'identification définitive (30).

Tritrichomonas foetus se multiplie par division binaire longitudinale et une reproduction sexuée n'est pas décrite. Des stades du parasite résistants dans l'environnement n'ont pas été observés.

Dans quelques études anciennes, 3 sérotypes ont été reconnus, basés sur l'agglutination (47) : la souche « *belfast* » serait prédominante en Europe, en Afrique et aux USA (23) ; la souche « *brisbane* » en Australie (13) ; et la souche « *manley* », qui a été rapportée seulement dans quelques foyers (47). Des travaux complémentaires doivent être réalisés dans le domaine de la comparaison des caractéristiques de croissance, de la variation génétique et antigénique d'isolats de *T. foetus* issus de différentes zones avant que les termes de « souches » et de « sérotype » puissent être établis et utilisés en toute confiance.

Tritrichomonas foetus peut être cultivé *in vitro*, de préférence en milieu de Diamond (11), de Clausen (23) ou en milieu Trichomonas, qui est disponible dans le commerce (45). Une épreuve de terrain disponible dans le commerce qui tient compte de la croissance des trichomonas et de l'examen microscopique direct sans aspiration du milieu inoculé a été développé aux USA (46, 51) (InPouch™ TF, voir note de bas de page n°2).

La transmission de l'infection se fait lors du coït, d'une insémination artificielle, ou d'un examen gynécologique des vaches. Le site d'infection des taureaux est primitivement la cavité préputiale (1, 40), et les manifestations cliniques qui en découlent sont faibles ou absentes. Pour les taureaux âgés de plus de 3 à 4 ans, la guérison spontanée a rarement lieu et ils deviennent une source permanente d'infection dans le troupeau. Chez les taureaux de moins de 3 à 4 ans, l'infection peut être transitoire.

Tritrichomonas foetus est présent en faible nombre dans la cavité préputiale des taureaux, avec une certaine concentration dans le fornix et autour du gland du pénis (24). Le taureau infecté de façon chronique ne présente pas de lésion macroscopique. Chez la vache infectée, la lésion initiale est une vaginite, qui peut être suivie par une invasion du col utérin et de l'utérus si la vache devient gestante. Diverses séquelles peuvent en résulter, incluant une inflammation du placenta qui peut conduire à un avortement précoce (1 à 16 semaines), un écoulement utérin et un pyomètre. Dans certains cas, malgré l'infection, la gestation ne se termine pas par un avortement et un veau normal naît à terme. À l'échelle d'un troupeau, les vaches après infection peuvent présenter des cycles oestriens irréguliers, des écoulements utérins, des pyomètres ou des avortements précoces (1, 18, 47). Les vaches récupèrent habituellement et deviennent généralement immunes, au moins pour la saison de reproduction suivant l'infection et l'avortement (1, 18, 49).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

a) Identification de l'agent par examen direct ou culture (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Un diagnostic provisoire de la trichomonose comme source de désordres de la reproduction dans un troupeau est basé sur l'histoire clinique, les signes d'avortement précoce, les retours répétés en chaleur, ou

les cycles oestriens irréguliers. La confirmation de l'infection dépend de la mise en évidence des parasites dans les fluides placentaires, les contenus stomacaux du fœtus avorté, les lavages utérins, les écoulements de pyomètres, le mucus vaginal ou le smegma préputial. Dans les troupeaux infectés, les matériaux les plus fiables pour le diagnostic sont les produits soit de lavages soit de raclage préputial ou vaginal (14, 29, 34, 36, 46).

Le nombre d'organismes varie dans différentes situations. Ils sont nombreux dans le fœtus avorté, dans l'utérus plusieurs jours après l'avortement, et chez les vaches infestées récemment, ils sont abondants dans le mucus vaginal 12 à 20 jours après infection. Chez les taureaux infectés, *T. foetus* est présent sur la muqueuse du prépuce et du pénis, apparemment sans envahir les tissus sous-muqueux. Il est généralement recommandé de laisser passer au moins une semaine après la dernière saillie avant de prélever un échantillon préputial.

- **Collecte d'échantillon**

Un certain nombre de techniques de collecte d'échantillons préputiaux chez les taureaux ou d'échantillons vaginaux chez les vaches ont été décrits. Il est important d'éviter la contamination fécale, car celle-ci peut introduire des protozoaires intestinaux qui pourraient être confondus avec *T. foetus* (50). La contamination des échantillons devrait être minimisée par le retrait de matériel accessoire et des poils souillés du pourtour de l'orifice préputial ou de la vulve ; cependant, un décapage de la zone, en particulier avec des désinfectants, est à éviter, car il peut réduire la sensibilité du diagnostic. Les échantillons peuvent être collectés chez les taureaux par raclage de la muqueuse préputiale ou pénienne avec une pipette à insémination artificielle (36, 46) ou une brosse métallique (35, 36), par lavage préputial (46) ou par lavage du vagin artificiel après collecte de sperme (23). La dernière technique n'est pas recommandée car sa sensibilité peut être plus faible (23). Les échantillons chez les vaches sont collectés par lavage du vagin, ou par raclage du col avec une pipette pour insémination artificielle ou une brosse métallique (29, 32).

Si les échantillons doivent être soumis à un laboratoire et ne peuvent pas être délivrés dans les 24 h, un milieu de transport, avec de préférence des antibiotiques, doit être utilisé (par exemple un bouillon thioglycollate avec antibiotiques [6, 51], la poche plastique pour culture de terrain, le milieu de Winter, une solution saline tamponnée avec du sérum de bovin fœtal à 5 %, ou du lait écrémé, avec ou sans antibiotiques [42]). Durant le transport, les organismes devraient être protégés contre l'exposition à la lumière et les températures extrêmes, température qui devrait rester supérieure à 5 °C et inférieure à 38 °C (6).

- **Culture**

Des cultures peuvent être réalisées lorsque les parasites sont trop peu nombreux pour permettre une détection directe et une identification précise. La culture des organismes est habituellement nécessaire parce que, dans la plupart des cas, le nombre de parasites n'est pas assez grand pour faire un diagnostic positif par examen direct. Plusieurs milieux peuvent être utilisés. Le milieu pour trichomonas de Diamond, le kit de culture disponible dans le commerce, le milieu CPLM (cysteine/peptone/Liver-infusion maltose), le milieu BGPS (Beef-extract/glucose/peptone serum), le milieu de Clausen (Neopeptone-Lemco-liver extract glucose) et le milieu Trichomonas d'Oxoid sont les milieux de choix (12, 33, 37, 45). L'inoculation des échantillons dans le milieu de culture devrait être faite le plus tôt possible après la collecte. Pour les échantillons récoltés par lavage préputial, il est nécessaire de traiter l'échantillon par centrifugation. Le culot est alors inoculé dans le milieu de culture. Certains protocoles recommandent l'examen direct de l'inoculum avant inoculation, mais cela n'augmente pas la sensibilité diagnostique. Il est aussi important de s'assurer que les milieux de culture sont utilisés avant leur date d'expiration, car de nombreux milieux ne sont pas stables. La qualité de l'eau utilisée est importante et un antifongique peut être ajouté dans les milieux pour contrôler la croissance des levures.

La détection initiale des organismes peut être faite par microscopie optique, sur une lame sertie humide préparée directement à partir de l'échantillon ou de la culture, ou grâce aux cupules plastiques du système InPouch™ (système InPouch™, voir note de bas de page n°2) en utilisant le clip plastique spécialement fourni. Les organismes mobiles peuvent être regardés à l'aide d'une variété de microscopes à lumière classiques en utilisant un grossissement de 100 ou plus. Un microscope inversé peut être utilisé pour examiner des tubes contenant un milieu de culture. Les milieux de culture devraient être examinés au microscope périodiquement du jour 1 au jour 7 après inoculation (31). Les organismes peuvent être identifiés sur la base de traits morphologiques caractéristiques. Les organismes en forme de poire ont 3 flagelles antérieurs et un flagelle postérieur et une membrane ondulante qui s'étend presque jusqu'à l'extrémité postérieure de la cellule. Ils ont aussi un axostyle qui s'étend habituellement au-delà de l'extrémité postérieure de la cellule. Pour révéler ces caractères, la microscopie en contraste de phase est

très précieuse, ainsi qu'une procédure récemment développée de coloration rapide (30). Ces deux techniques sont plus efficaces quand un nombre relativement grand d'organismes est présent, spécialement dans la technique par coloration.

- **Moyens de culture**

- *Milieu de Diamond modifié*

La verrerie utilisée pour les cultures devrait être lavée avec de l'eau distillée (en évitant l'usage de détergents). Le milieu de Diamond modifié consiste en : 2 g de trypticase peptone, 1 g d'extrait de levures, 0,5 g de maltose, 0,1 g de chlorhydrate de L-cystéine et 0,02 g d'acide L-ascorbique, complété avec 90 ml d'eau distillée contenant 0,08 g de K_2HPO_4 et 0,08 g de KH_2PO_4 . Il est ajusté à un pH compris entre 7,2 et 7,4 avec de l'hydroxyde de sodium ou de l'acide hypochlorique. Après l'ajout de 0,05 g de gélose, le milieu est autoclavé pendant 10 min à 121 °C, refroidi à 49 °C, puis 10 ml de sérum de bovin inactivé (inactivé par chauffage à 56 °C pendant 30 min), 100 000 unités de pénicilline C cristalline et 0,1 g de sulfate de streptomycine sont ajoutés de façon aseptique. Le milieu est stérilement distribué en fractions aliquotes de 10 ml dans des flacons à bouchon à vis stériles de 16 × 125 mm et réfrigérés à 4 °C jusqu'à utilisation. Le milieu devrait être cultivé pendant au moins 7 jours, les échantillons étant examinés tous les jours (1, 31). L'incorporation de gélose dans le milieu limite largement les organismes contaminants dans la partie supérieure milieu de culture, tandis que des conditions micro-aérophiles sont maintenues dans le fond où les trichomonas se développent en plus grand nombre.

- *Épreuve de culture sur le terrain*

Lorsque l'aspect pratique et la sensibilité doivent être combinés, l'épreuve de culture sur le terrain (voir note de bas de page n°2) peut être utilisée (1, 5, 37, 46, 51). Elle consiste en une poche plastique transparente souple avec deux parties. La chambre supérieure contient un milieu spécial dans lequel l'échantillon est introduit. Les échantillons de terrain pour inoculation directe dans la poche de culture devraient normalement être collectés par la technique de raclage préputial (1, 46). Les échantillons collectés par lavage préputial nécessitent une centrifugation avec introduction du culot dans la chambre supérieure. Après mélange, le milieu est introduit de force dans la chambre inférieure et la poche est alors scellée et incubée à 37 °C. Un examen direct pour rechercher les trichomonas peut être fait directement à travers la poche plastique (5). Les résultats diagnostiques avec les échantillons issus de taureaux utilisant soit le milieu de Diamond soit le kit adapté pour le terrain ont montré que les deux méthodes donnent des résultats comparables mais il y a certains avantages (dans l'aspect pratique et dans les résultats de l'épreuve) à utiliser le kit (5, 6, 29, 37, 46).

- **Sensibilité et spécificité globales des épreuves de culture et d'identification**

Toute estimation de la sensibilité et de la spécificité diagnostiques d'une épreuve de culture et d'identification sera dépendante de l'efficacité de la collecte de l'échantillon, de sa manipulation et de son traitement, aussi bien que de la composition et de la qualité du milieu de culture. Chez les taureaux, la sensibilité du kit de diagnostic InPouch™ TF a été estimée à 92 % (avec un intervalle de confiance à 95 % de 84 à 96 %) (36). Les estimations pour les milieux de Diamond et apparentés ont été variables, éventuellement à cause de variations dans la composition et la préparation, mais s'étendent de 78 à 99 %. Jusqu'à récemment, il a été considéré que la spécificité d'une épreuve de culture est de 100 %, mais il est probable que c'est une surestimation.

Tout échantillon prélevé sur un taureau connu comme infecté ne donnera pas nécessairement un résultat de culture positif. Même dans les conditions optimales d'échantillonnage, de transport, de culture et d'identification, plus d'un échantillon négatif devrait être obtenu avant qu'il soit raisonnable de considérer l'animal comme non infecté. Pour estimer la probabilité qu'un animal n'est pas infecté, la valeur prédictive négative devrait être calculée en utilisant une estimation de la sensibilité de l'épreuve de diagnostic et la probabilité pré-évaluée d'infection de l'animal (36). L'infection des femelles est habituellement éliminée en 90 à 95 jours ; il peut donc être difficile d'isoler les parasites à partir d'animaux à des stades tardifs de leur infection. Chez des jeunes vaches infestées expérimentalement, en utilisant la méthode de culture InPouch™ TF, une sensibilité apparente de 88 % est atteinte au cours d'une période de 10 semaines post-infection (29).

Le diagnostic d'avortement induit par *T. foetus* peut être relativement facile quand le fœtus avorté est retrouvé, grâce au grand nombre de parasites mis en évidence dans le contenu abomasal du fœtus ou dans les fluides placentaires. De plus, des techniques immunohistochimiques et les techniques basées sur l'ADN peuvent être utilisées pour démontrer l'envahissement tissulaire de *T. foetus* dans l'avorton.

b) Réaction d'amplification en chaîne par polymérase

Les techniques de biologie moléculaire qui utilisent la technologie de réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été développées pour l'identification de *T. foetus* (7, 17, 26, 39). Le développement d'une épreuve de diagnostic par PCR offre un certain nombre d'avantages potentiels, incluant une augmentation de la sensibilité d'analyse, un délai plus court d'obtention des résultats diagnostiques, et le fait que les organismes dans l'échantillon collecté ne sont pas nécessairement vivants. Un diagnostic par PCR comprend à la fois une technique spécifique d'extraction de l'ADN et l'amplification de celui-ci à partir d'amorces spécifiques par les techniques de la PCR. La sensibilité et la spécificité de ce test dépendent du choix de la technique d'extraction, du choix des conditions de la PCR et du choix des amorces. Des études antérieures ont démontré que la PCR est capable de détecter un très petit nombre de parasites issus de culture de laboratoire en l'absence de matériel préputial (17, 26), ainsi que dans du matériel préputial (17, 26, 39). Cependant, dans les échantillons préputiaux, un nombre élevé de parasites est nécessaire pour donner un résultat PCR positif, cela étant probablement dû à l'inhibition par les composants du smegma préputial. Plusieurs techniques d'extraction de l'ADN ont été décrites (17, 26, 39) et il est probable que la sensibilité de l'épreuve de diagnostic sera influencée par l'efficacité de la méthode d'extraction et les procédures utilisées pour vaincre les inhibiteurs contaminants. La spécificité diagnostique de l'épreuve par PCR dépend beaucoup de la spécificité des amorces. Un jeu d'amorces (26) a donné des produits non spécifiques de taille similaire dans approximativement un tiers des échantillons témoins négatifs (16) et ne devrait pas être utilisé pour le diagnostic. Un jeu d'amorces basé sur la séquence 5,8 de l'ARN ribosomal a démontré une bonne spécificité diagnostique dans les échantillons issus d'animaux négatifs (TFR3 et TFR4, 17), et sont les amorces les plus fréquemment citées dans la littérature. Cependant ces amorces produisent des produits d'amplification à partir de certains autres flagellés étroitement apparentés (*Tritrichomonas suis*, *T. mobilensis* et un trichomonas du chat) qui sont indistincts de ceux de *T. foetus* (17, 21). Ces espèces ne peuvent du reste pas être distinguées au microscope et il est possible que certaines de ces espèces soient synonymes de *T. foetus*. Un travail récent a démontré que ces amorces peuvent être utilisées pour faire la différence entre *T. foetus* et des trichomonas autres que *T. foetus* parfois trouvés dans les échantillons préputiaux (4, 7, 38).

La sensibilité et la spécificité de ces épreuves diagnostiques doivent encore être précisée sur un échantillon adéquate d'animaux positifs et négatifs, bien que la recherche jusqu'à maintenant laisse à penser que la spécificité est bonne (7, 43). La sensibilité des tests PCR a été estimée égale à celle du kit de culture InPouch™ TF (7), mais sur très peu d'animaux. Les techniques PCR sont une solution alternative attrayante à la microscopie du fait de leur plus grande rapidité et qu'elles permettent aussi la détection des organismes morts. La validation des techniques PCR devrait être poursuivie et de grands échantillons d'animaux connus comme positifs ou négatifs devraient être testés. Les techniques basées sur l'ADN sont suffisamment performantes pour être potentiellement utilisées comme test de première intention ou complémentaires (4, 7, 17, 34, 39) et jouer un rôle clé dans la différenciation des protozoaires trichomonas isolés de l'appareil reproductif des bovins. Selon une étude récente, plusieurs différentes approches sur la base de travaux précédents qui utilisaient le couple d'amorces (TFR3 et TFR4 ; [17]) ont diagnostiqué spécifiquement *T. foetus*. Pour faire la distinction entre des organismes considérés comme des contaminants fécaux des organes de la reproduction des bovins, d'une part, et *T. foetus* d'autre part (7), une étude utilisait deux couples d'amorces, un couple amplifiant l'ADN du groupe trichomonas (TFR1 et TFR2 ; [15]) et l'autre spécifique de *T. foetus* (TFR3 et TFR4 ; [17]). Une alternative proposait d'utiliser les amorces génériques (TFR1 et TFR2 ; [15]) pour amplifier l'ADN puis de différencier les différentes espèces de trichomonas en utilisant une analyse RFLP (25). Dans une troisième étude, un autre couple d'amorces a été conçu pour amplifier des amplicons de tailles différentes à partir de protozoaires trichomonas, permettant ainsi de distinguer différentes espèces (22). Il a été aussi démontré qu'un test PCR peut être utilisé pour détecter l'ADN de *T. foetus* dans des tissus d'endomètre ou de fœtus avortés fixés dans du formol (2).

2. Épreuves immunologiques

Plusieurs épreuves immunologiques ont été utilisées dans le passé ou ont été récemment mises au point pour le diagnostic de la trichomonose bovine. Cependant, leur utilisation est limitée et elles ne sont pas recommandées pour la détection des infections à *T. foetus* chez l'animal individuel. Dans les années 1940, des épreuves d'agglutination sur mucus et des épreuves de diagnostic intradermique ont été développées mais des problèmes de sensibilité et de spécificité restreignent leur utilité. D'autres épreuves immunologiques basées sur une méthode immuno-enzymatique de capture d'antigène sont maintenant en cours de développement (1, 20). Les techniques immunohistochimiques utilisant des anticorps monoclonaux ont été indiquées pour révéler les protozoaires *T. foetus* dans des tissus fixés dans du formol (43).

a) Épreuve d'agglutination sur mucus

Une épreuve d'agglutination sur mucus qui détecte environ 60 % des vaches infestées naturellement, avec des niveaux d'anticorps variant en relation avec le stade de l'oestrus, a été développée dans les années 1940 (28, 41). Les échantillons de mucus sont récoltés dans la région cervicale du vagin, de préférence peu

de jours après l'œstrus. Les anticorps apparaissent dans le mucus cervical environ 6 semaines après l'infection, et persistent pendant plusieurs mois. Les anticorps peuvent aussi être trouvés dans les sécrétions préputiales (44, 48). L'épreuve d'agglutination sur mucus est plus utile comme épreuve de troupeau, étant capable de détecter des infections latentes ou récemment éliminée.

Un tube en verre stérile, de 30 cm de longueur, 9 mm de diamètre, et courbé à un angle de 150° approximativement à 9 cm de l'extrémité, ou une pipette pour insémination artificielle devrait être employé pour prélever l'échantillon cervical. Du mucus contenant du sang ne devrait pas être utilisé et l'animal devrait être ré-échantillonné. Le sérum contenant des anticorps non spécifiques permettra à l'agglutination d'avoir lieu. Le mucus est dilué au 1/5^e avec du soluté physiologique et émulsifié dans un tube de Griffith. Des échantillons en double, dilués au 1/10^e et 1/20^e, sont préparés en pipétant 2 ml de mucus et 2 ml de gélose fondue (à 56 °C au bain-marie) dans les tubes pour la dilution au 1/10^e, et 1 ml de mucus, 1 ml de soluté physiologique et 2 ml de gélose fondue pour la dilution au 1/20^e. Des témoins en double contenant 2 ml de soluté physiologique et 2 ml de gélose fondue sont aussi préparés. Tous les tubes sont gardés au bain-marie à 56 °C pendant le mélange puis coulés individuellement dans des boîtes de Petri de 5 cm et mis à refroidir. L'antigène de l'épreuve est préparé en ajoutant lentement une culture de trichomonas à un mélange 2/1 de soluté physiologique et de bouillon glucosé à 1 % pour atteindre une concentration approximative de 100 000 organismes/ml (approximativement 6 trichomonas/champ de microscope au grossissement 400). Ensuite, 1,5 ml d'antigène est ajouté dans chaque boîte de Petri ; les boîtes sont incubées pendant 1,5 h à 37 °C puis laissées à température ambiante pendant 1,5 h supplémentaire. L'observation d'une agglutination à la dilution de 1/10^e est considérée comme positive.

b) Épreuve intradermique « Tricin »

Une intradermoréaction pour le diagnostic de la trichomonose bovine a été décrite (27). Le site d'injection est la peau de l'encolure, semblable au site utilisé pour l'épreuve de tuberculination. Une dose de 0,1 ml d'antigène « Tricin » est injectée par voie intradermique et la réaction est mesurée 30 à 60 min plus tard. La réaction consiste en une plaque superficielle observée à l'œil nu et montrant une augmentation de plus de 2 mm de l'épaisseur de la peau.

c) Immunohistochimie sur tissus

Il existe des lésions macroscopiques ou microscopiques sur les fœtus avortés et l'identification des parasites est nécessaire pour le diagnostic. Une technique immunohistochimique utilisant un anticorps monoclonal (AcM) pour détecter *T. foetus* dans le placenta et les poumons de fœtus issus d'avortement de bovins, fixés dans du formol et inclus dans de la paraffine, a été rapportée (43). La coloration immunohistochimique est faite en utilisant un système streptavidine/biotine marqué⁴ disponible commercialement et un AcM (34.7C4.4) pour *T. foetus*. Dans la procédure, des coupes déparaffinées de 4 µm sont incubées avec l'AcM puis bloquées avec du sérum de chèvre non immun. Après 3 rinçages dans un tampon, les coupes sont incubées avec une immunoglobuline biotinylée de chèvre anti-souris et anti-lapin pendant 30 min à 37 °C. À la suite de 3 rinçages supplémentaires dans un tampon, la streptavidine marquée à la peroxydase est appliquée pendant 30 min à 37 °C, et l'enzyme active est diluée avec l'AEC à 3 % (3-amino-9-ethylcarbazole) dans du N,N diméthylformamide. Les coupes passent dans une coloration de contraste avec de l'hématoxyline Gill II pendant 3 min, sont rincées et colorées en bleu dans un tampon pendant 1 min. Cette méthode a été utilisée pour diagnostiquer les avortements causés par *T. foetus*.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Les vaccins cellulaires entiers pour les vaches ont été présentés comme offrant une protection et sont disponibles dans le commerce (10) soit comme vaccin « bactérien inactivé » monovalent, soit comme vaccin polyvalent contenant aussi *Campylobacter* et *Leptospira spp.* (Vaccin CL) (Voir note de bas de page n°3). Ces produits se sont montrés efficaces chez les femelles mais pas chez les taureaux (3). Cela est en contradiction avec des études plus anciennes en Australie dans lesquelles la protection ou même l'élimination est possible pour les taureaux recevant des fractions membranaires ou glycoprotéiques de *T. foetus* (8, 9). Des anticorps spécifiques ont été mis en évidence dans du sérum et du mucus vaginal de jeunes vaches inoculées avec un vaccin contenant *T. foetus* (20). Dans cette étude, un vaccin cellulaire entier tué partiellement efficace ne prévient pas l'infection, mais semble permettre la clearance de l'infection chez les femelles vaccinées avant la période de gestation où le fœtus présente le plus de risque d'avortement. Des recherches pour des vaccins plus efficaces qui se servent d'antigènes membranaires de surface issus de *T. foetus* sont actuellement réalisées et offrent des perspectives pour une meilleure efficacité et le développement de vaccin recombinant (10, 19).

4 DAKO Corporation, Carpinteria, California, USA.

Un exemple d'une méthode de production d'un vaccin cellulaire entier est celle qui consiste en la croissance de *T. foetus* (culture VMC-84) dans le milieu de Diamond modifié (10) et la congélation de la culture à –20 °C pendant 60 min. Après décongélation, une suspension de 5×10^7 organismes/ml dans une solution physiologique tamponnée au phosphate est ajoutée au vaccin-CL.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BONDURANT R.H. (1997). Pathogenesis, diagnosis and management of trichomoniasis in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **13**, 345–361.
2. BONDURANT R.H., CAMPERO C.M. ANDERSON M.L. & HOOSEAR K.A. (2003). Detection of *Tritrichomonas foetus* by polymerase chain reaction in culture isolates, cervicovaginal mucus, and formalin-fixed tissues from infected heifers and fetuses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 579–584.
3. BONDURANT R.H., CORBEIL R.R. & CORBEIL L.B. (1993). Immunisation of virgin cows with surface antigen TF1.17 of *Tritrichomonas foetus*. *Infect. Immun.*, **61**, 1385–1394.
4. BONDURANT R.H., GAJADHAR A., CAMPERO C.M., ET AL. (1999). Preliminary characterization of a *Tritrichomonas foetus*-like protozoan isolated from preputial smegma of virgin bulls. *Bov. Pract.*, **33**, 124–127.
5. BORCHARDT K.A., NORMAN B.B., THOMAS M.W. & HARMON W.M. (1992). Evaluation of a new culture method for diagnosing *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Med.*, **87**, 104–112.
6. BRYAN L.A., CAMBELL J.R. & GAJADHAR A.A. (1999). Effects of temperature on the survival of *Tritrichomonas foetus* in transport, Diamond's and InPouch™ TF media. *Vet. Rec.*, **144**, 227–232.
7. CAMPERO C.M., RODRIGUEZ DUBRA C., BOLONDI A., CACCIATO C., COBO E., PEREZ S., ODEON A., CIPOLLA A. & BONDURANT R.H. (2003). Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T. foetus* trichomonads from genitalia of virgin bulls in Argentina. *Vet. Parasitol.*, **112**, 167–175.
8. CLARK B.L., DUFTY J.H. & PARSONSON I.M. (1983). Immunisation of bulls against trichomoniasis. *Aust. Vet. J.*, **60**, 178–179.
9. CLARK B.L., EMERY D.L. & DUFTY J.H. (1983). Therapeutic immunisation of bulls with the membranes and glycoproteins of *Tritrichomonas foetus* var *brisbane*. *Aust. Vet. J.*, **61**, 65–66.
10. CORBEIL L.B. (1994). Vaccination strategies against *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol. Today*, **10**, 103–106.
11. DIAMOND L.S. (1983). Lumen dwelling protozoa: entamoeba, trichomonads and giardia. In: *In Vitro Cultivation of Protozoan Parasites*, Jensen J.B., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 65–109.
12. EAGLESOME M.D. & GARCIA M.M. (1992). Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part 1. *Brucella*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Bull.*, **62**, 743–775.
13. ELDER J.K. (1964). Examination of twelve strains of *Trichomonas foetus* (Reidmuller) isolated in Queensland and the description of a new serotype, *T. foetus* var. *brisbane*. *Queensl. J. Agric. Sci.*, **21**, 193–203.
14. EUROPEAN UNION (1988). Council Directive EEC 88/407 of 14th June 1988 laying down the animal health requirements applicable to intra-community trade in and imports of deep-frozen semen of domestic animals of the bovine species. *Off. J. European Communities Council*, **194**, 10–23.
15. FELLEISEN R. (1997). Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitol.*, **115**, 111–119.
16. FELLEISEN R.J., SCHMID-LAMBELET N. & GOTTSTEIN B. (1997). Comparative evaluation of methods for the diagnosis of bovine *Tritrichomonas foetus* infection. *J. Protozool. Res.*, **7**, 90–101.
17. FELLEISEN R.S.J., LAMBELET N., BACHMANN P., NICOLET J., MULLER N. & GOTTSTEIN B. (1998). Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 513–519.

18. FITZGERALD P.R. (1986). Bovine trichomoniasis in parasites: epidemiology and control. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, **2**, 277–282.
19. GAULT R.A., HALL M.R., KVASNICKA W.G. & HANKS D.R. (1999). Characterisation of antigenic proteins from *Tritrichomonas foetus* recognised by antibodies in rabbit, serum, bovine serum and bovine cervicovaginal mucus. *J. Parasitol.*, **85**, 244–251.
20. GAULT R.A., KVASNICKA W.G. HANKS D., HANKS M. & HALL M.R. (1995). Specific antibodies in serum and vaginal mucus of heifers inoculated with a vaccine containing *Tritrichomonas foetus*. *Am. J. Vet. Res.*, **56**, 454–459.
21. GOOKIN J.L., BIRKENHEUER A.J., BREITSCHWERDT E.B. & LEVY M.G. (2002). Single-tube nested PCR for detection of *Tritrichomonas foetus* in feline feces. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 4126–4130.
22. GRAHN R.A., BONDURANT R.H., HOOSEAR K.A., WALKER R.L. & LYON L.A. (2005). An improved molecular assay for *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Parasitol.*, **127**, 33–41.
23. GREGORY M.W., ELLIS B. & REDWOOD D.W. (1990). Comparison of sampling methods for the detection of *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Rec.*, **127**, 16.
24. HAMMOND D.M. & BARTLETT D.E. (1943). The distribution of *Trichomonas foetus* in the preputial cavity of infected bulls. *Am. J. Vet. Res.*, **4**, 143–149.
25. HAYES D.C., ANDERSON R.R. & WALKER R.L. (2003). Identification of trichomonadid protozoa from the bovine preputial cavity by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism typing. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 390–394.
26. HO M.S.Y., CONRAD P.A., CONRAD P.J., LEFEBVRE R.B., PEREZ B. & BONDURANT R.H. (1994). The detection of bovine trichomoniasis with a specific DNA probe and PCR amplification system. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 98–104.
27. KERR W.R. (1944). The intradermal test in bovine trichomoniasis. *Vet. Rec.*, **56**, 303–305.
28. KERR W.R. & ROBERTSON M. (1941). An investigation into the infection of cows with *Trichomonas foetus* by means of the agglutination reaction. *Vet. J.*, **97**, 351–363.
29. KITTEL D.R., CAMPERO C., VAN HOOSEAR K.A., RHYAN J.C. & BONDURANT R.H. (1998). Comparison of diagnostic methods for detection of active infection with *Tritrichomonas foetus* in beef heifers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **213**, 519–522.
30. LUN Z.-R. & GAJADHAR A.A. (1999). A simple and rapid method for staining *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 471–474.
31. LUN Z.-R., PARKER S. & GAJADHAR A.A. (2000). Comparison of growth rates in *Trichomonas foetus* isolates from various geographic regions using three different culture media. *Vet. Parasitol.*, **89**, 199–208.
32. MANCEBO O.A., RUSSO S.M., CARABAJAL L.L. & MONZON C.M. (1995). Persistence of *Tritrichomonas foetus* in naturally infected cows and heifers in Argentina. *Vet. Parasitol.*, **59**, 7–11.
33. MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (MAFF) (1986). Manual of Veterinary Parasitological Techniques, Reference Book 418. HMSO, London, UK.
34. MUKHUFHI N., IRONS P.C., MICHEL A. & PETA F. (2003). Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. *Theriogen.*, **60**, 1269–1278.
35. OSTROWSKI J.E.B., BAIGUN R., FRENE A.J., RODRIGUEZ DUBRAC C. & RUTTER R. (1974). Obtencion de muestras prepuciales para el diagnostico de *Trichomonas foetus* por raspado de mucosa (Comunicacion previa). *Rev Med. Vet.*, **55**, 525–528.
36. PARKER S., CAMPBELL J.R., RIBBLE C. & GAJADHAR A.A. (1999). Comparison of two sampling tools for diagnosis of *Tritrichomonas foetus* in bulls and clinical interpretation of culture results. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **215**, 231–235.

37. PARKER S., CAMPBELL J. & GAJADHAR A. (2003). Comparison of the diagnostic sensitivity of a commercially available culture kit and a diagnostic culture test using Diamond's media for diagnosing *Tritrichomonas foetus* in bulls. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 460–465.
38. PARKER S., CAMPBELL J., MCINTOSH K., & GAJADHAR A. (2003). Diagnosis of trichomoniasis in 'virgin' bulls by culture and polymerase chain reaction. *Can. Vet. J.*, **44**, 732–734.
39. PARKER S., LUN Z-R. & GAJADHAR A. (2001). Application of a PCR assay to enhance the detection and identification of *Tritrichomonas foetus* in cultured preputial samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 508–513.
40. PARSONSON I.M., CLARK B.L. & DUFTY J.H. (1974). The pathogenesis of *Tritrichomonas foetus* infection of the bull. *Aust. Vet. J.*, **50**, 421–423.
41. PIERCE A.C. (1949). The mucus agglutination test for the diagnosis of bovine trichomoniasis. *Vet. Rec.*, **61**, 347–349.
42. REECE R.L., DENNETT D.P. & JOHNSON R.H. (1983). Some observations on cultural and transport conditions for *Trichomonas foetus* var *brisbane*. *Aust. Vet. J.*, **60**, 62–63.
43. RHYAN J.C., WILSON K.L., BENGESE D.E., STAOKHOUSE L.L. & QUINN W.J. (1995). The immunohistochemical detection of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed paraffin-embedded sections of bovine placenta and fetal lung. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**, 98–101.
44. RHYAN J.C., WILSON K.L., WAGNER B., ANDERSON M.L., BONDURANT R.H., BURGESS D.E., MUTWIRI G.K. & CORBEIL L.B. (1999). Demonstration of *Tritrichomonas foetus* in the external genitalia and of specific antibodies in preputial secretions of naturally infected bulls. *Vet. Pathol.*, **36**, 406–411.
45. RIBEIRO L.M.M. (1990). An efficient medium for the isolation of *Tritrichomonas foetus*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **57**, 209–210.
46. SCHONMANN M.J., BONDURANT R.H., GARDNER L.A., VAN HOESEAR K., BALTZER W. & KACHULIS C. (1994). Comparison of sampling and culture methods for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls. *Vet. Rec.*, **134**, 620–622.
47. SKIRROW S.Z. & BONDURANT R.H. (1988). Bovine trichomoniasis. *Vet. Bull.*, **58**, 591–603.
48. SOTO P. & PARMA A.E. (1989). The immune response in cattle infected with *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Parasitol.*, **33**, 343–348.
49. SOULSBY E.J.L. (1982). Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, Seventh Edition. Balliere Tindall, London, UK, 556–561.
50. TAYLOR M.A., MARSHALL R.N. & STACK M. (1994). Morphological differentiation of *Tritrichomonas foetus* from other protozoa of the bovine reproductive tract. *Br. Vet. J.*, **150**, 73–80.
51. THOMAS M.W., MARMON W.M. & WHITE C. (1990). An improved method for the detection of *Tritrichomonas foetus* infection by culture in bulls. *Agri-Practice*, **11**, 13–17.
52. WARTON A. & HONIGBERG B.M. (1979). Structure of trichomonads as revealed by scanning electron microscopy. *J. Protozoot.*, **26**, 56–62.

*
* *

TRYPANOSOMOSSES

(transmises par les tsé-tsé)

RÉSUMÉ

Définition de la maladie : les trypanosomoses¹ transmises par les tsé-tsé désignent un ensemble de maladies causées par plusieurs espèces de protozoaires parasites du genre *Trypanosoma*, essentiellement transmises de manière cyclique par le genre *Glossina* (mouches tsé-tsé), mais aussi transmises mécaniquement par des insectes piqueurs (tabanidés, stomoxes, etc.). Les maladies peuvent affecter diverses espèces de mammifères mais d'un point de vue économique, les trypanosomoses transmises par les tsé-tsé sont particulièrement importantes chez le bétail. Elles sont dues principalement à *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* et de façon moindre à *T. brucei*.

Description de la maladie : Les trypanosomoses transmises par les mouches tsé-tsé sont classiquement des maladies aiguës ou chroniques qui provoquent des accès de fièvre et sont accompagnées par de l'anémie, des œdèmes, du larmolement, une hypertrophie des nœuds lymphatiques, de l'avortement, une diminution de la fertilité, une perte de l'appétit et une baisse de poids, conduisant à une mort prématurée dans les formes aiguës, ou à des signes digestifs et/ou nerveux avec émaciation et à une mort plus tardive dans les formes chroniques.

Identification de l'agent pathogène : plusieurs techniques de détection parasitaire peuvent être utilisées, incluant l'examen microscopique d'une goutte de sang frais et de sang en goutte épaisse ou mince colorée. La sensibilité diagnostique est augmentée de façon significative en concentrant les parasites avant l'examen et en y associant un microscope à contraste de phase ou à fond noir. Les techniques de concentration parasitaire ont également l'avantage supplémentaire de déterminer l'hématocrite et l'importance de l'anémie soit de façon individuelle ou pour le troupeau. L'amplification en chaîne par polymérase (PCR), méthode hautement spécifique et sensible, est utilisée dans un nombre croissant de laboratoires ; elle peut, selon les cas, identifier les parasites jusqu'au niveau du genre, de l'espèce et de la sous-espèce.

Épreuves sérologiques : deux méthodes de détection d'anticorps, l'immunofluorescence indirecte et la méthode immuno-enzymatique (ELISA) sont utilisées en routine chez le bétail. Elles sont très sensibles et spécifiques, mais ne peuvent être utilisées que pour un diagnostic de suspicion de trypanosomose. La méthode ELISA en particulier peut être automatisée et pourra être normalisée quand des antigènes recombinants auront été produits et validés. Cependant, ils sont actuellement réalisés avec des antigènes solubles natifs de trypanosomes cultivés sur rongeurs et ont une sensibilité et une spécificité satisfaisantes.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : aucun vaccin n'est utilisé à ce jour. Des produits biologiques obtenus à partir de parasites cultivés sont disponibles et utilisés dans les épreuves d'immunofluorescence indirecte et d'ELISA indirect.

1 Note sur la nomenclature des maladies parasitaires : La WAAVP (*World Association for Advances in Veterinary Parasitology*) a recommandé une « Nomenclature harmonisée des maladies parasitaires animales » (Kassai T., Cordero del Campillo M., Euzeby J., Gaafar S., Hiepe Th. & Himonas C.A. [1988]. *Vet. Parasitol.*, **29**, 299 à 326). En principe, le nom de la maladie est conçu en ajoutant le suffixe « -ose » à la racine du taxon parasite. Cette terminologie a été suivie dans ce *Manuel terrestre* et « trypanosomoses » remplace désormais l'ancien terme de « trypanosomiases ».

A. INTRODUCTION

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés qui vivent dans le plasma sanguin, la lymphe et divers tissus de leurs hôtes. Le genre *Trypanosoma* appartient à la branche des protozoaires, ordre des Kinetoplastida, famille des Trypanosomatidae. Les trypanosomes transmis par les glossines appartiennent à la section « salivaire », et aux sous-genres *Nannomonas* pour ce qui est de *T. congolense*, *Duttonella* pour *T. vivax* et *Trypanozoon* pour *T. brucei* ssp.

Les trypanosomoses transmises par les tsé-tsé désignent un ensemble de maladies causées par plusieurs espèces de protozoaires parasites du genre *Trypanosoma*, essentiellement transmises de façon biologique par le genre *Glossina* (mouches tsé-tsé) mais qui peuvent aussi être transmises mécaniquement par des insectes piqueurs. Les tsé-tsé infestent 10 millions de km² et affectent 37 pays, la plupart africains où elles sont connues sous le nom de « nagana ». La maladie concerne des espèces variées de mammifères mais, d'un point de vue économique, les trypanosomoses transmises par les tsé-tsé sont particulièrement importantes chez le bétail. Les espèces importantes sont *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* et de façon moindre, *T. brucei brucei*. *Trypanosoma uniforme* et *T. simiae* sont des espèces moins communes transmises par les tsé-tsé. *Trypanosoma vivax* est également transmis mécaniquement par des mouches piqueuses (parmi lesquelles les tabanidés et les stomoxes sont réputés les plus importants), comme le démontre sa présence en Amérique du centre et du sud ou sa présence en Afrique dans des régions où les glossines sont absentes (Éthiopie, Tchad, etc.). Les trypanosomoses transmises par les tsé-tsé peuvent aussi affecter les camélidés et elles constituent une barrière naturelle à l'introduction des ces animaux dans les régions du sud du Sahel en Afrique de l'Ouest. Les chevaux sont également très sensibles. Par ailleurs, les trypanosomoses transmises par les glossines peuvent aussi affecter l'homme, provoquant la maladie du sommeil due à *T. brucei gambiense* ou *T. brucei rhodesiense*. Un spectre très large d'animaux domestiques ou sauvages peuvent jouer le rôle de réservoir de ces parasites de l'homme ; un soin particulier doit donc être apporté lors de manipulations par des humains de produits biologiques pouvant contenir des parasites de l'homme, notamment à partir du bétail.

Les signes cliniques des trypanosomoses transmises par les tsé-tsé peuvent comprendre une fièvre intermittente, des œdèmes, des avortements, une baisse de fertilité et de l'amaigrissement. L'anémie est observée habituellement chez l'animal parasité, suivie d'une dégradation de l'état général, d'une baisse des productions et souvent de mortalité. Les lésions *post mortem* peuvent comprendre l'amaigrissement, une adénomégalie, une hépatomégalie et splénomégalie, la présence de liquide dans les cavités corporelles, des pétéchies et des hémorragies. Chez l'animal mort durant la phase chronique de la maladie, les organes lymphoïdes ne sont pas augmentés de volume et une myocardite sévère est fréquemment observée. Aucun signe clinique ou lésion *post mortem* des trypanosomoses transmises par les tsé-tsé n'est pathognomonique. Par conséquent, le diagnostic doit reposer sur des techniques directes qui confirment la présence de trypanosomose soit par observation microscopique directe, soit par des méthodes indirectes de sérologie, soit encore par l'amplification en chaîne par polymérase (PCR). Sur la base des signes cliniques, les trypanosomoses peuvent être confondues avec les babésioses, l'anaplasmose, les theilérioses, l'haemonchose et même les ehrlichioses, la rage ou une intoxication par des plantes. Le diagnostic différentiel est basé sur les observations cliniques, l'évolution de la maladie, le contexte épidémiologique, mais il est essentiel de le confirmer par le laboratoire.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Plusieurs techniques de diagnostic sont disponibles (30) et les recherches actuelles tentent de les améliorer et d'en développer de nouvelles. Les techniques de diagnostic courantes varient en sensibilité et spécificité, dans la facilité d'application et leur coût (28). Le choix d'une technique de diagnostic reposera sur des règles économiques et une validation disponible, mais particulièrement sur les conditions diagnostiques. Par exemple, différents seuils de sensibilité et de spécificité sont utilisés pour la confirmation de l'infection chez un animal en comparaison avec la détection de l'infection au sein d'un troupeau. De façon comparable, les techniques de diagnostic pour établir la prévalence parasitaire des trypanosomoses ne sont pas celles qui sont requises pour établir la présence ou l'absence de la maladie dans une zone donnée. Un diagnostic fiable peut être obtenu en combinant plusieurs techniques de diagnostic appropriées. L'interprétation des résultats dépendra autant de la validité de l'épreuve que de la nature et de la taille de l'échantillon et de la façon avec laquelle les épreuves sont réalisées.

1. Identification de l'agent responsable

Les techniques de détection parasitaire sont très spécifiques mais leur sensibilité est relativement faible (c'est-à-dire une proportion élevée de faux négatifs). La sensibilité est particulièrement faible quand les résultats concernent un animal plutôt que le troupeau. La sensibilité varie beaucoup au cours de l'infection : (i) dans les premières phases, la sensibilité est élevée car les parasites se multiplient activement dans le sang en l'absence de toute réponse immunologique ; (ii) pendant la phase chronique, la sensibilité est faible en raison du petit

nombre de parasites (rarement observés dans le sang), du fait de la réponse immunitaire de l'hôte ; (iii) et enfin la sensibilité est quasiment nulle chez les porteurs sains chez qui on observe jamais de parasites. Au niveau d'une population animale, ces variations signifient que les techniques de détection des parasites sont hautement sensibles au cours des flambées épizootiques (quand la plupart des animaux sont dans les premières phases de l'infection), et qu'elles sont peu, voire très peu, sensibles dans les régions d'enzootie (où la majorité des animaux sont dans la phase chronique de l'infection), spécialement pendant les phases inapparentes de l'infection (porteurs sains). En raison de sa faible sensibilité, la prévalence parasitaire apparente des trypanosomoses est un peu ou beaucoup plus faible que la prévalence véritable. La faible sensibilité diagnostique rend difficile la détection des trypanosomoses quand elles sont de faible prévalence parasitaire et il est impossible d'établir l'absence de maladie avec un taux élevé de confiance. En outre, dans les zones où les trypanocides sont largement utilisés, les parasites peuvent ne pas être détectés.

Plusieurs techniques de détection du parasite sont disponibles, chacune de sensibilité variable. Le choix dépendra de l'équipement disponible au laboratoire et de la finalité du diagnostic.

- **Techniques d'examen direct**

Les techniques les plus simples sont l'examen d'une goutte de sang frais, d'une goutte épaisse ou d'un étalement mince de sang habituellement obtenu à partir de la veine auriculaire, jugulaire ou de la queue. Parmi les techniques d'examen direct, l'étalement de sang coloré est considéré généralement comme plus spécifique mais moins sensible que les deux autres. La véritable spécificité et sensibilité de ces techniques sont directement liées au volume de sang réellement examiné et au savoir-faire et à l'expérience du technicien observateur.

- a) **Goutte de sang frais**

Cet examen est réalisé en déposant une gouttelette de sang (environ 2 µl) sur une lame porte-objet puis recouverte d'une lamelle (22 × 22 mm). Le sang est examiné au microscope à un grossissement de × 400, avec condensateur, contraste de phase ou contraste interférentiel. Approximativement 50 à 100 champs microscopiques sont observés. Les trypanosomes peuvent être reconnus par leur mouvement parmi les globules rouges.

La méthode est simple, bon marché et donne un résultat immédiat. En fonction des dimensions et des mouvements du trypanosome, une hypothèse de diagnose spécifique peut être faite. La confirmation finale de l'espèce est réalisée par l'examen d'une préparation colorée.

La sensibilité diagnostique de cette méthode est généralement faible mais dépend de l'expérience de l'examineur et de l'intensité de la parasitémie. La sensibilité peut être augmentée de façon significative par la lyse des globules rouges avant examen, en utilisant un agent hémolytique comme le SDS (sodium dodecyl sulfate).

- b) **Goutte épaisse**

Cet examen est réalisé en plaçant une goutte de sang (5 à 10 µl) sur une lame porte-objet et en l'étalant sur une surface d'environ 2 cm de diamètre en utilisant le coin d'une autre lame. L'épaisseur du film doit être telle que, après séchage, les chiffres d'un cadran de montre puissent être lus au travers de la lame. Le séchage est effectué en agitant la lame qui, sans fixation, est immergée dans l'eau distillée pendant quelques secondes pour provoquer l'hémolyse, puis séchée avant coloration. L'étalement séché doit être conservé au sec et à l'abri de la poussière, de la chaleur, des mouches et autres insectes. Il est coloré avec la solution de Giemsa à 4 % dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) à pH 7,2 durant 30 min. Le temps de coloration et la dilution de la solution varient en fonction du colorant et de la méthode. Par conséquent, il est important de suivre les recommandations du fabricant et d'adapter le temps de coloration et la concentration du colorant pour obtenir un résultat optimal. Le frottis coloré est ensuite rincé avec de l'eau tamponnée et examiné au grossissement de × 500 ou × 1 000.

La méthode est simple et relativement peu chère mais les résultats sont différés du fait de la coloration. Les trypanosomes sont aisément reconnus par leur aspect morphologique, mais peuvent être déformés durant la coloration. Cela peut rendre difficile l'identification des espèces.

- c) **Étalement mince de sang**

Les étalements de sang en goutte mince sont réalisés en déposant une petite goutte de sang (environ 5 µl), par exemple à partir d'un microtube capillaire à hématocrite, approximativement à 20 mm de l'extrémité d'une lame porte-objet (laissant ainsi l'espace libre à un examen en goutte épaisse) et étalant le sang avec le bord d'une autre lame. Cette lame est inclinée selon un angle de 30° environ avec la première lame et tirée en arrière pour rentrer en contact avec la gouttelette. Le sang se répand ainsi le long du bord de la lame qui est ensuite poussée vers l'autre extrémité de façon rapide et régulière. Si la quantité de sang

utilisée est correcte, la lame doit être recouverte d'un film (ayant la forme d'une balle) de sang homogène. De façon idéale, les étalements doivent être préparés de telle sorte que les globules rouges soient contigus mais sans se superposer. La lame est séchée rapidement à l'air et protégée de la poussière, des mouches et autres insectes. La lame est fixée dans le méthanol durant 3 min et colorée comme la goutte épaisse. Après coloration, la lame est rincée à l'eau du robinet et séchée. Une variante de la méthode consiste à fixer au méthanol durant 2 min, à appliquer le colorant de May-Grünwald pendant 2 min, puis à ajouter un volume équivalent d'eau tamponnée à pH 7,2, à laisser enfin le mélange ainsi obtenu durant 8 min avant d'éliminer le liquide. Approximativement, 50 à 100 champs de l'étalement coloré doivent être examinés à l'objectif 50, puis 100 avec l'huile à immersion avant de considérer l'échantillon comme négatif. Même après l'observation d'un trypanosome, environ 20 champs supplémentaires doivent être examinés pour déterminer la présence d'espèces différentes. La partie pointue de l'étalement doit être particulièrement explorée car les trypanosomes peuvent, par capillarité, se concentrer à ce niveau (ceci est particulièrement vrai pour des espèces comme *T. brucei* et *T. vivax*).

La technique décrite ci-dessus peut être également utilisée sur des prélèvements de lymphes obtenus par ponction de nœuds lymphatiques.

Habituellement, la goutte épaisse et l'étalement sur lame sont faits à partir du même échantillon. La goutte épaisse concerne plus de sang que l'étalement et par conséquent a une sensibilité diagnostique supérieure. D'un autre côté, l'étalement autorise une diagnose d'espèces. Les espèces de trypanosomes peuvent être identifiées selon les critères morphologiques suivants :

Trypanosoma vivax : 20 à 27 µm de longueur, membrane ondulante peu visible, portion libre du flagelle présente à l'extrémité antérieure, extrémité postérieure arrondie, kinétoplaste grand et terminal

Trypanosoma brucei est une espèce polymorphe. Deux formes différentes peuvent être distinguées, d'une part une forme mince et allongée et d'autre part une forme courte et trapue. Des formes intermédiaires possédant les caractères des deux formes, longue et courte, sont souvent observées. Le cytoplasme renferme fréquemment des granules basophiles chez les exemplaires colorés.

Trypanosoma brucei (forme allongée et mince) : 17 à 30 µm de longueur sur 2,8 µm de largeur, membrane ondulante évidente, portion libre du flagelle présente à l'extrémité antérieure, extrémité postérieure pointue, kinétoplaste petit et subterminal.

Trypanosoma brucei (forme courte et trapue) : 17 à 22 µm de longueur sur 3,5 µm de largeur, membrane ondulante bien visible, portion libre du flagelle absente, extrémité postérieure pointue, kinétoplaste petit et subterminal.

Trypanosoma congolense : 8 à 25 µm (petite espèce) de longueur, membrane ondulante peu visible, portion libre du flagelle absente, extrémité postérieure arrondie, kinétoplaste de dimensions moyennes et terminal, souvent en position latérale. Bien que *T. congolense* soit considéré comme une espèce monomorphe, un certain degré de variabilité morphologique est parfois observé. À l'intérieur de *T. congolense*, différents types ou sous-groupes existent (savane, forêt, kilifi, tsavo) qui ont un pouvoir pathogène différent (2). Toutefois, ces types ne peuvent être distingués que par la PCR.

Trypanosoma theileri (grande espèce) : typiquement de 60 à 70 µm de longueur, mais les dimensions individuelles peuvent aller de 19 à 120 µm (21, 25), membrane ondulante évidente, longue portion libre du flagelle, extrémité postérieure pointue, kinétoplaste grand, proche du noyau et en position marginale. *Trypanosoma theileri* est normalement non pathogène, mais sa présence peut gêner la diagnose parasitaire. En Europe de l'ouest, *T. theileri* est la seule espèce de trypanosome observée chez le bétail.

• Techniques de concentration parasitaire

La probabilité de détecter des trypanosomes dans un échantillon provenant d'un animal infecté dépend largement de la quantité de sang examiné et du niveau de parasitémie. La quantité de sang examiné avec les techniques d'examen direct est faible et les parasites sont souvent peu abondants dans le sang d'un animal infecté. Ces deux facteurs contribuent à une faible sensibilité des techniques d'examen direct. La sensibilité peut être accrue en augmentant le volume de sang examiné et en concentrant les trypanosomes.

a) Technique de centrifugation en microtubes à hématocrite (méthode de Woo)

La technique de centrifugation en microtubes à hématocrite ou méthode de Woo (35) est largement utilisée pour le diagnostic des trypanosomoses animales. Elle est fondée sur la séparation des différents composants de l'échantillon de sang en fonction de leur gravité spécifique. La méthode se déroule comme suit :

- i) du sang frais de la veine auriculaire (environ 70 µl) est collecté sur tube capillaire hépariné (75 × 1,5 mm) ;
- ii) une extrémité du tube capillaire est bouchée à la plasticine ou par chauffage, en s'assurant que la colonne de sang n'est pas carbonisée par la flamme ;
- iii) le tube capillaire scellé est placé dans une centrifugeuse à microtube à hématocrite avec l'extrémité obturée dirigée vers l'extérieur. Pour assurer un bon équilibre, les tubes sont placés de façon symétrique ;
- iv) le couvercle est vissé et la centrifugeuse fermée ;
- v) les tubes capillaires sont soumis à une centrifugation de 9 000 **g** pendant 5 min ;
- vi) un porte-tube est conçu à partir d'une lame porte-objet sur laquelle deux morceaux de verre de 25 × 10 × 1,2 mm sont fixés, séparés de 1,5 mm pour former une rainure ;
- vii) le tube est placé dans la rainure, surmonté d'une lamelle couvre-objet, l'interface étant inondé d'eau ; alternativement, l'examen peut être réalisé sans inonder l'interface, mais dans ce cas le condensateur doit être placé de telle façon que les cellules deviennent réfringentes.
- viii) l'interface plasma/globules blancs (*buffy coat*) est examiné lentement en faisant tourner le tube. Les mouvements des trypanosomes peuvent être détectés en premier en utilisant l'objectif de 10 et une ouverture réduite du condenseur, ils peuvent être plus clairement observés en utilisant l'objectif de 40 avec une distance telle qu'elle est en adéquation avec la profondeur de champ au travers du tube capillaire.

La technique de centrifugation en microtube à hématocrite est plus sensible que les techniques d'examen direct (19). Dans le cas d'infections à *T. vivax*, la sensibilité de la méthode de Woo approche 100 % quand la parasitémie est supérieure à 700 trypanosomes/ml de sang. La sensibilité décroît à 50 % quand la parasitémie oscille entre 60 et 300 trypanosomes/ml de sang. Les trypanosomes deviennent très difficiles à détecter quand la parasitémie est inférieure à 60 trypanosomes/ml de sang (10). L'identification de l'espèce de trypanosome est difficile. Comme la gravité de *T. congolense* est proche de celle des globules rouges, les parasites sont souvent observés en dessous du *buffy coat*, dans la couche des globules rouges. Pour augmenter la séparation globules rouges-parasites et accroître la sensibilité pour *T. congolense*, la gravité propre des globules rouges peut être augmentée par addition de glycérol.

Une modification de la méthode de Woo est la méthode quantitative du *buffy coat* (QBC) (1). La méthode a été utilisée pour le diagnostic des infections à *T. b. gambiense*. La méthode est généralement trop chère pour une utilisation de routine à grande échelle dans la surveillance des trypanosomoses animales.

b) Technique du *buffy coat* en contraste de phase ou sur fond noir (Méthode de Murray)

La technique du *buffy coat* ou méthode de Murray (26) représente une technique améliorée de détection des trypanosomes et est largement utilisée. Elle repose sur les étapes i) à v) décrites ci-dessus après laquelle le tube est coupé avec un diamant, 1 mm en dessous du *buffy coat*, en y incluant la couche supérieure des globules rouges. Le *buffy coat* et la couche supérieure des globules rouges sont déposés sur une lame (vérifier que le *buffy coat* ne colle pas à la paroi du tube capillaire ; il doit être visible sur la lame avant de la recouvrir d'une lamelle [22 × 22 mm]). Environ 200 champs de la préparation sont examinés en vue de déceler des trypanosomes mobiles, avec l'objectif × 40 d'un microscope à fond noir ou à contraste de phase. Les espèces de trypanosomes peuvent être identifiées en référence aux critères suivants :

Trypanosoma vivax : grand, extrêmement mobile, traverse très rapidement le champ, s'arrêtant occasionnellement.

Trypanosoma brucei : dimensions variées, mouvements rapides dans des zones limitées ; la membrane ondulante capture la lumière dans des « poches » qui bougent le long du corps.

Trypanosoma congolense : petit, peu mobile, adhère aux globules rouges par son extrémité antérieure.

Trypanosoma theileri : plus de 2 fois les dimensions des trypanosomes pathogènes, tend à tourner ; l'extrémité postérieure, allongée et pointue, est clairement visible.

Comme la technique de centrifugation des microtubes à hématocrite, la technique du *buffy coat* est plus sensible que les techniques d'examen direct. La sensibilité de la méthode du *buffy coat* peut être augmentée en utilisant la technique de la double centrifugation (19). Une quantité totale de 1 500 à 2 000 µl de sang est

centrifugée, puis le *buffy coat* est recueilli dans un tube capillaire à hématocrite et centrifugé de nouveau. Le *buffy coat* est examiné. La récolte du *buffy coat* après la centrifugation initiale est toutefois une étape délicate et les résultats peuvent varier d'un technicien à l'autre.

En comparaison avec la technique de centrifugation à microtube, cette technique présente l'avantage supplémentaire de pouvoir fixer et colorer les préparations pour une identification précise des espèces et pour l'enregistrement permanent.

La centrifugation à microtube et la technique du *buffy coat* donnent des résultats directs et peuvent être utilisées pour contrôler de grands effectifs d'animaux. Elles requièrent un équipement spécialisé et de l'électricité rendant ces techniques plus onéreuses que l'examen à l'état frais. Cependant, ceci est compensé par une sensibilité accrue. Les deux techniques s'appuient sur la détection de trypanosomes vivants et mobiles. Parce que les trypanosomes peuvent perdre leur vigueur et mourir rapidement une fois le prélèvement effectué, les échantillons collectés en tubes capillaires doivent être refroidis immédiatement et ne pas être chauffés dans la centrifugeuse à hématocrite ou sur le plateau du microscope. Les échantillons doivent être examinés aussi tôt que possible après leurs prélèvements, si possible dans les 2 h.

La centrifugation en microtube à hématocrite et la technique du *buffy coat* sont particulièrement utiles dans la mesure où l'hématocrite (PCV, *Packed Cell Volume*) peut être évaluée en même temps. Pour déterminer le PCV après centrifugation, le tube capillaire à hématocrite (contenant du sang de la veine auriculaire ou jugulaire) est placé dans un lecteur à hématocrite. La hauteur de la colonne des globules rouges est exprimée comme un pourcentage du volume total de sang. Mesurer le PCV est utile pour déterminer l'importance de l'anémie. L'anémie peut être causée par d'autres facteurs que les trypanosomoses transmises par les tsé-tsé. Elle reste néanmoins comme l'un des indicateurs les plus importants des trypanosomoses du bétail. Comme les trypanosomoses sont un problème de troupeau, le niveau de l'hématocrite d'un troupeau est influencé par le nombre d'animaux infectés par des trypanosomes et peut être utilisé pour apprécier l'importance de la maladie. Le PCV moyen est aussi influencé par l'âge et le niveau de susceptibilité génétique du bétail.

c) Échange d'anions

La technique de chromatographie en minicolonne d'échange d'anions est largement utilisée pour le diagnostic de la maladie du sommeil humaine causée par *T. b. gambiense* (23). Le sang est passé à travers d'une colonne de diéthyl amino-éthyl (DEAE)-cellulose équilibrée par une solution tampon (PBS) et d'une teneur ionique adaptée au sang de l'espèce animale examinée. Comme les globules rouges sont chargés plus négativement que les trypanosomes, ils sont retenus dans la colonne, contrairement aux trypanosomes qui passent au travers avec l'éluat. Celui-ci, une fois collecté, est centrifugé pour concentrer les trypanosomes et les examiner au microscope.

De grandes quantités de sang peuvent être examinées pour chaque animal et la méthode a une sensibilité élevée. Néanmoins, la technique n'est pas adaptée à l'examen d'un grand nombre d'animaux car elle est onéreuse et prend beaucoup de temps.

d) Culture *in vitro*

Un procédé de culture *in vitro* de *T. brucei* a été décrit, mais la réussite a été irrégulière au cours de ces dernières années. En outre, la méthode nécessite un équipement sophistiqué, produit des résultats après un temps important et n'est pas adaptée à une utilisation à grande échelle. Un kit de diagnostic (KIVI) pour l'isolement *in vitro* des trypanosomes a présenté un intérêt pour l'isolement et l'amplification de toutes les espèces de *T. brucei* chez l'homme, les animaux domestiques et sauvages (31). La valeur de l'épreuve pour l'isolement de *T. congolense* et de *T. vivax* n'est pas encore connue. Comme il est basé sur la culture des formes procycliques de trypanosomes, la différenciation spécifique n'est pas possible (18). Il convient de noter que la culture est une méthode très efficace et sensible pour détection de *T. theileri* transmis par les tabanidés ; avec cette technique, la prévalence approche 100 %. Dans le cas d'infections mixtes, *T. theileri* supplante *T. b. brucei* au niveau de la culture (33).

• Inoculation à l'animal

L'inoculation de sang à des rongeurs, habituellement souris ou rats, est particulièrement utile pour révéler des infections sous-patentes. Les animaux de laboratoire reçoivent, par voie intrapéritonéale, 0,2 à 5 ml (en fonction de la taille du rongeur) de sang fraîchement collecté. Une immunodépression artificielle de l'animal receveur par irradiation ou par un traitement médicamenteux augmente considérablement les chances d'isoler le parasite. Une ponction de sang est réalisée 3 fois par semaine pendant au moins 2 mois. Le sang collecté est examiné à l'état frais.

L'inoculation à l'animal est plus sensible que l'examen direct à l'état frais. Néanmoins, la méthode n'est pas pratique ; elle est chère et le diagnostic n'est pas immédiat. La méthode est très sensible pour la détection des infections à *T. b. brucei*. (il s'agit d'une technique de choix pour la détection des trypanosomes non transmis par les glossines : *T. evansi*) Cependant, quelques souches de *T. congolense* ne sont pas facilement transmissibles et *T. vivax* infecte rarement les rongeurs utilisés dans les laboratoires. En outre, l'inoculation à l'animal doit être évitée parce qu'elle soulève des problèmes éthiques liés au bien-être animal.

- **Épreuve de détection des antigènes de trypanosomes**

Des méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) de détection d'antigènes pour les trypanosomoses ont été décrites (27). Les évaluations de terrain de ces épreuves ont donné des résultats variables (5, 15). En outre, des travaux supplémentaires ont été menés sous contrôle et ont montré que la sensibilité et la spécificité de ces tests ne conviennent pas pour le diagnostic des trypanosomoses (4, 5, 7, 11).

- **Épreuves d'amplification de l'ADN**

Une méthode PCR a été développée comme outil diagnostique des infections à trypanosomes africains chez l'homme et l'animal, aussi bien que chez la mouche tsé-tsé. Des séquences répétées et spécifiques d'ADN nucléaire peuvent être amplifiées pour *T. vivax* et 3 types de *T. congolense* (5, 8, 24) ; néanmoins, les amorces classiques pour *T. vivax* ne semblent pas capables d'amplifier quelques génotypes à l'intérieur de cette espèce. Un ensemble d'amorces est disponible pour la détection des 3 sous-espèces de *T. brucei*. Les amorces disponibles pour les différents sous-genres, espèces et types de trypanosomes sont référées comme suit : *T. brucei* sous-genre – TBR1 et TBR2 ; *T. congolense* (type savane) – TCN1 et TCN2 ; *T. congolense* (type forêt) – TCF1 et TCF2 ; *T. congolense* (type côte kényane) – TCK1 et TCK2 ; et *T. vivax* – TWV1 et TWV2. En raison de la multiplicité des amorces spécifiques de taxons pour les mouches tsé-tsé et le bétail, l'identification d'espèce d'un trypanosome requiert que 5 PCR soit réalisées sur chaque échantillon, ce qui accroît considérablement le coût du diagnostic. Récemment, des tests d'analyse du polymorphisme de la longueur de fragments de restriction (RFLP) et d'amplification de la partie ITS1 de l'ADN ribosomal ont été développés permettant l'identification de toutes les espèces de trypanosomes en infection simple ou mixte et en utilisant une seule épreuve (3, 8, 9, 12). Néanmoins, ces tests ne conviennent pas encore au diagnostic de routine. Une technique d'amplification à température ambiante (avec amplification en boucle) est en cours de développement pour le diagnostic des trypanosomes (20).

Les amplifications usuelles pour une PCR sont réalisées en utilisant un mélange renfermant du Tris/HCl, MgCl₂, KCl, les 4 désoxyribonucléotides triphosphates, les amorces, la matrice d'ADN et la polymérase Taq à ADN. Les échantillons sont incubés pour plusieurs cycles à des températures différentes. Les résultats de la PCR sont soumis à électrophorèse sur agarose. Les gels sont ensuite colorés au bromure d'éthidium et les produits avec leur poids spécifiques sont visualisés sous lumière ultra-violette.

La procédure est extrêmement sensible mais des faux positifs peuvent être observés comme le résultat d'une contamination d'échantillons avec d'autres ADN. L'épreuve requiert un équipement spécialisé et du personnel hautement formé, aussi n'est-il pas adapté dans de nombreux laboratoires. Les faux négatifs peuvent être observés quand la parasitémie est très faible (inférieure à 1 trypanosome/ml de sang), ce qui se produit fréquemment dans les infections chroniques, cela peut également se produire quand la spécificité des sondes est trop élevée de sorte que tous les isolats d'une espèce particulière de trypanosome ne peuvent pas être reconnus. La collecte des échantillons a été simplifiée en adaptant l'épreuve à du sang ou le *buffy coat* récolté sur papier filtre (12, 16). Un grand nombre d'échantillons peut être analysé en une fois, rendant ainsi la PCR adaptée à des suivis à grande échelle. Néanmoins, aujourd'hui, le coût de la PCR est prohibitif pour une utilisation de routine de cette épreuve.

2. Épreuves sérologiques

Plusieurs techniques de détection d'anticorps ont été développées pour le diagnostic des trypanosomoses animales, avec des sensibilité et spécificité variables. La méthode de choix est l'immunofluorescence indirecte (IFI) (17) et l'ELISA (14, 22). L'identification des antigènes majeurs de trypanosomes et leur production comme molécules recombinantes ou peptides de synthèse devraient conduire, nous l'espérons, au développement et à la validation de nouvelles épreuves basées sur l'utilisation de ces molécules. Dans un avenir proche, il est possible d'augmenter la spécificité des épreuves sérologiques permettant la détection d'anticorps spécifiques d'espèces, et d'atteindre un haut niveau de normalisation qui n'est actuellement pas obtenu en utilisant des extraits totaux de parasites.

a) Épreuve d'immunofluorescence indirecte

La méthode originelle de cette épreuve (34) a été remplacée par une nouvelle technique de préparation des antigènes de trypanosomes (17) qui implique la fixation de trypanosomes vivants en utilisant un mélange d'acétone froid (80 %) et de formol à 0,25 % dans du sérum physiologique.

- **Protocole**

- i) Préparer un étalement mince à partir de sang à forte parasitémie ou d'une suspension de trypanosomes. Sécher à l'air et fixer dans l'acétone pendant 5 min ;
- ii) Dessiner des cercles de 5 mm de diamètre sur les lames en utilisant du vernis à ongles ;
- iii) En utilisant une pipette, placer le sérum à tester dilué au 1/40 dans chaque cercle en s'assurant que la surface de chaque cercle est complètement recouverte ;
- iv) Incuber le mélange antigène/sérum à tester à 37 °C pendant 30 min dans une étuve humide ;
- v) Laver la préparation 3 fois avec du PBS, 5 min à chaque fois à 4 °C, en agitant légèrement. Sécher les lames à l'air ;
- vi) Appliquer le conjugué : IgG anti-bovin (pour tester un sérum de bovin) préparé sur chèvre ou lapin conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine ;
- vii) Incuber et laver comme ci-dessus. Rincer à l'eau distillée. Sécher à l'air les lames ;
- viii) Monter les lames dans le PBS ou le glycérol tamponné et examiner la fluorescence.

b) Épreuve immuno-enzymatique à détection d'anticorps

L'ELISA originel (22) a récemment été développé pour un usage à grande échelle de surveillance des trypanosomoses bovines (6, 14). Des recommandations ont été rédigées qui permettent la production des antigènes et la normalisation des tests au niveau local (6, 7, 13, 36).

L'antigène de référence pour l'épreuve de détection d'anticorps provient des trypanosomes présents dans le sang. Les trypanosomes sont purifiés par chromatographie sur colonne DEAE d'échangeuse d'ions de parasites provenant du sang de rats infectés. Les antigènes sont préparés comme une fraction soluble lysés par 7 cycles de congélation-décongélation (avec addition d'anti-enzyme) et centrifugation à 10 000 *g* pendant 30 min. Des antigènes issus des formes procycliques de trypanosomes cultivés *in vitro* peuvent également être utilisés (13). Les antigènes solubles sont conservés à –80 °C pour de longues périodes ou à –20 °C pour de courtes périodes, mais ils peuvent aussi être lyophilisés et conservés à température ambiante. Des microplaques pour ELISA sensibilisées avec *T. congolense* ou *T. vivax* ont été mis au point ; leur avantage tient au fait qu'un antigène dénaturé normalisé est utilisé qui peut être conservé à température ambiante pendant longtemps (29).

L'IFI et l'ELISA pour la détection d'anticorps ont été adaptés pour analyser des échantillons de sang collecté sur papier filtre. Le sang maintenu dans un microtube capillaire hépariné à hématocrite est versé sur un papier filtre (Whatman® n°4). Les échantillons sont séchés à l'air, à l'abri de la lumière, placés dans un sac en plastique avec un substrat dessiccant. Le sac est scellé et doit être conservé au frais tant que les échantillons ne sont pas réfrigérés ou congelés.

Chaque microplaque à ELISA est étalonnée avec un sérum de référence fortement positif, faiblement positif et négatif qui sont nécessaires pour définir les valeurs témoins dans le cadre de la démarche qualité. La valeur de chaque échantillon testé en ELISA est exprimée comme un pourcentage (pourcentage de positivité, PP) du sérum de référence fortement positif (36) ou des sérums de référence faiblement positif et négatif (6). Les résultats sont ainsi quantifiables. Le seuil est déterminé en utilisant des échantillons connus positifs et négatifs ou des échantillons expérimentaux (6, 7).

Ces deux épreuves ont une haute sensibilité et spécificité pour le genre. Leur spécificité d'espèce est généralement faible, mais elle peut être améliorée en utilisant l'ensemble des trois tests spécifiques d'espèce normalisés (7). Ils détectent une réponse immune aux infections actuelles et passées et ne peuvent fournir, par conséquent, qu'un diagnostic de présomption d'une infection active. Cependant, la persistance des anticorps après traitement ou auto-guérison, est estimée à 3 ou 4 mois lors d'infections du bétail (7), quoique il faille parfois jusqu'à 13 mois pour que tous les anticorps aient disparu (32). Des échantillons appropriés et une connaissance exacte des traitements trypanocides apporteront donc une meilleure information.

L'immunodiagnostic nécessite des équipements onéreux et sophistiqués et une expérience qui ne sont pas toujours disponibles. Il est réalisé dans des laboratoires spécialisés et il y a un délai substantiel entre la réalisation de l'échantillon et l'obtention des résultats. Néanmoins, l'ELISA se prête bien à un haut degré d'automatisation et de normalisation. La récolte d'échantillons est rendue aisée par l'utilisation de papier

filtre. Tous ces facteurs font que l'ELISA est une épreuve très utile pour une surveillance à grande échelle de la distribution des trypanosomoses transmises par tsé-tsé.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Aucun vaccin ni produit biologique n'est utilisé à ce jour. La seule condition pour les produits biologiques destinés au bétail est de cultiver les parasites sur rongeurs afin d'éviter la présence de composants du bétail dans les réactifs pour l'IFI et l'ELISA.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BAILEY J.W. & SMITH D.H. (1992). The use of the acridine orange QBC technique in the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86**, 630.
2. BENGALY Z., SIDIBE I., GANABA R., DESQUESNES M., BOLY H. & SAWADOGO L. (2002). Comparative pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: clinical observations and haematological changes. *Vet. Parasitol.*, **108**, 1–19.
3. DELESPAUX V., AYRAL F., GEYSEN D. & GEERTS S. (2003). PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification: applicability for the diagnosis of mixed infections with different trypanosome species in cattle. *Vet. Parasitol.*, **117**, 185–193.
4. DESQUESNES M. (1996). Evaluation of three antigen detection tests (monoclonal trapping ELISA) for African trypanosomes, with an isolate of *Trypanosoma vivax* from French Guyana. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **791**, 172–184.
5. DESQUESNES M. (1997). Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme-linked-immunosorbent assay. *Acta Trop.*, **65**, 139–148.
6. DESQUESNES M. (1997). Standardisation internationale et régionale des épreuves immuno-enzymatiques: méthode, intérêts et limites. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **16**, 809–823.
7. DESQUESNES M. (2004). Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America. OIE and CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement). World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France, 192 pp. ISBN 92-9044-634-X.
8. DESQUESNES M. & DAVILA A.M.R. (2002). Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes; a review and perspectives. *Vet. Parasitol.*, **109**, 213–231.
9. DESQUESNES M., McLAUGHLIN G., ZOUNGRANA A. & DAVILA A.M.R. (2001). Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int. J. Parasitol.*, **31**, 610–614.
10. DESQUESNES M. & TRESSE L. (1996). Evaluation de la sensibilité du test de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax*. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **49**, 315–321.
11. EISLER M.C., LESSARD P., MASAKE R.A., MOLOO S.K. & PEREGRINE A.S. (1998). Sensitivity and specificity of antigen-capture ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle. *Vet. Parasitol.*, **79** (3), 187–201.
12. GEYSEN D., DELESPAUX V. & GEERTS S. (2003). PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Vet. Parasitol.*, **110**, 171–180.
13. GREINER M., KUMAR S. & KYESWA C. (1997). Evaluation and comparison of antibody ELISAs for serodiagnosis of bovine trypanosomosis. *Vet Parasitol.*, **73**, 197–205.

14. HOPKINS J.S., CHITAMBO H., MACHILA N., LUCKINS A.G., RAE P.F., VAN DEN BOSSCHE P. & EISLER M.C. (1998). Adaptation and validation of the antibody trapping ELISA using dried blood spots on filter paper, for epidemiological surveys of tsetse transmitted trypanosomosis in cattle. *Prev. Vet. Med.*, **37**, 91–99.
15. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA) (1993). Improving the Diagnosis and Control of Trypanosomiasis and Other Vector-borne Diseases of African Livestock Using Immunoassay Methods. IAEA-TECDOC 707, IAEA, Vienna, Austria.
16. KATAKURA K., LUBINGA C., CHITAMBO H. & TRADA Y. (1997). Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies in cattle in Zambia by polymerase chain reaction from blood collected on a filter paper. *Parasitol. Res.*, **83**, 241–245.
17. KATENDE J.M., MUSOKE A.J., NANTULYA V.M. & GODDEERIS B.M. (1987). A new method for fixation and preservation of trypanosomal antigens for use in the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of bovine trypanosomiasis. *Trop. Med. Parasitol.*, **38**, 41–44.
18. KOMOIN-OKA C., TRUC P., BENGALY Z., FORMENTY P., DUVALLET G., LAUGINIE F., RAATH J.P., N'DEPO A.E. & LEFORBAN Y. (1994). Etude de la prévalence des infections à trypanosomes chez différentes espèces d'animaux sauvages du parc national de la Comoé en Côte d'Ivoire : résultats préliminaires sur la comparaison de trois méthodes de diagnostic. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **47**, 189–194.
19. KRATZER R.D. & ONDIEK F.O. (1989). The buffy coat double centrifugation technique, an improved method for the diagnosis of African trypanosomiasis. Nairobi: OAU/IBAR (Organization of African Unity/Interafrican Bureau for Animal Resources). International Scientific Committee for Trypanosomosis Research and Control (ISCTRC), Mombassa, Kenya, April 1989.
20. KUBOKI N., INOUE N., SAKURAI T., DI CELLO F., GRAB D.J., SUZUKI H., SUGIMOTO C. & IGARASHI I. (2003). Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J. Clin. Microbiol.*, **41** (12), 5517–5524.
21. LEVINE N.D. (1985). Veterinary Protozoology. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 46–47.
22. LUCKINS A.G. (1977). Detection of antibodies in trypanosome infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop. Anim. Health Prod.*, **9**, 53–62.
23. LUMSDEN W.H.R., KIMBER C.D., EVANS D.A. & DOIG S.J. (1979). *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: adaptation for field use. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **73**, 312–317.
24. MASIGA D.K., SMYTH A.J., HAYES P., BROMIDGE T.J. & GIBSON W.C. (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Parasitol.*, **22**, 909–918.
25. MATTHEWS D.M. (1979). *Trypanosoma theileri* Laveran, 1902, in Wyoming cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **40**, 623–629.
26. MURRAY M., MURRAY P.K. & MCINTYRE W.I.M. (1977). An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **71**, 325–326.
27. NANTULYA M.V. & LINDQUIST K.J. (1989). Antigen-detection enzyme immunoassays for the diagnosis of *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* and *T. brucei* infections in cattle. *Trop. Med. Parasitol.*, **40**, 267–272.
28. PARIS J., MURRAY M. & MCODIMBA F. (1982). A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Trop.*, **39**, 307–316.
29. REBESKI D.E., WINGER E.M., OKORO H., KOWALIK S., BURGER H.J., WALTERS D.E., ROBINSON M.M., DWINGER R.H. & CROWTHER J.R. (2000). Detection of *Trypanosoma congolense* antibodies with indirect ELISAs using antigen-precoated microtitre plates. *Vet Parasitol.*, **89**, 187–198.
30. TOURE S.M. (1976). Diagnostic des trypanosomiasés animales. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **30**, 1–10.
31. TRUC P., AERTS D., McNAMARA J.J., CLAES Y., ALLINGHAM R., LE RAY D. & GODFREY D.G. (1992). Direct isolation *in vitro* of *Trypanosoma brucei* from man and other animals, and its potential value for the diagnosis of Gambian trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86**, 627–629.

32. VAN DEN BOSSCHE P., CHIGOMA D. & SHUMBA W. (2000). The decline of anti-trypanosomal antibody levels in cattle after treatment with trypanocidal drugs and in the absence of tsetse challenge *Acta Trop.*, **77**, 263–270.
33. VERLOO D., BRANDT J., VAN MEIRVENNE N. & BUSCHER P. (2000). Comparative *in vitro* isolation of *Trypanosoma theileri* from cattle in Belgium. *Vet. Parasitol.*, **89**, 129–132.
34. WILSON A.J. (1969). Value of the indirect fluorescent antibody test as a serological aid to diagnosis of *Glossina*-transmitted bovine trypanosomiasis. *Trop. Anim. Health Prod.*, **1**, 89–95.
35. WOO P.T.K. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop.*, **27**, 384–386.
36. WRIGHT P.F., NILSSON E., VAN ROOIJ E.M.A., LELENTA M. & JEGGO M.H. (1993). Standardisation 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.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de références de l'OIE pour les trypanosomoses transmises par les tsé-tsé (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).

SECTION 2.5.

EQUIDAE

CHAPITRE 2.5.1.

PESTE ÉQUINE

RÉSUMÉ

La peste équine (PE) est une maladie virale infectieuse mais non contagieuse, frappant toutes les espèces d'équidés, due à un orbivirus de la famille des Reoviridae et caractérisée par une atteinte des fonctions respiratoire et circulatoire. La PE est transmise par au moins deux espèces de Culicoides. Neuf sérotypes différents ont été décrits.

Tous les sérotypes de virus de la PE se rencontrent en Afrique de l'Est et du Sud. Seuls les sérotypes 9 et 4 ont été trouvés en Afrique de l'Ouest d'où ils gagnent parfois les pays circumméditerranéens. Les exemples d'épizooties survenues hors d'Afrique sont : Le Moyen-Orient (1959-1963), l'Espagne (sérototype 9, 1966, sérototype 4, 1987-1990), et le Portugal (sérototype 4, 1989).

Le diagnostic de laboratoire de la PE est fondamental. Bien que les signes cliniques et les lésions soient très évocateurs, ils peuvent être confondus avec ceux d'autres maladies équines.

En tant que maladie virale, le diagnostic de laboratoire peut reposer sur l'identification du virus infectieux, de son acide nucléique, des antigènes viraux ou des anticorps spécifiques. Durant ces dernières années, une grande variété d'épreuves de laboratoire a été adaptée à la détection à la fois du virus (AHSV, African Horse Sickness Virus) et de ses anticorps spécifiques.

Identification de l'agent pathogène : *il est important d'effectuer l'isolement et le sérotypage du virus chaque fois que des foyers apparaissent hors des régions d'enzootie.*

Le virus équinestique peut être isolé du sang prélevé durant la phase fébrile initiale. Pour isoler le virus, les autres tissus de choix sont représentés par la rate, le poumon et les nœuds lymphatiques, prélevés lors de l'autopsie. Les préparations peuvent être inoculées en cultures de cellules, telles que celles de rein de jeune hamster (BHK-21), de singe (MS) ou de rein de singe vert africain (Vero), et par voie intra-cérébrale au souriceau nouveau-né. Différentes méthodes immuno-enzymatique (ELISA) ont été mises au point pour la détection rapide d'antigènes viraux dans la rate et le surnageant de cultures de cellules infectées. L'identification de l'ARN viral a aussi été réalisée à l'aide de la technique de transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR). Les virus isolés peuvent être sérotypés par une réaction sérologique spécifique telle qu'une séroneutralisation virale (SN), par une transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) et par séquençage.

Épreuves sérologiques : *les chevaux qui survivent à une infection naturelle développent des anticorps vis-à-vis du sérotipe viral infectant, en 8 à 12 jours après l'infection. Ceci peut être démontré par plusieurs méthodes sérologiques telles que la réaction de fixation du complément, l'ELISA, l'immuno-empreinte et la SN. Cette dernière est utilisée pour le sérotypage. D'autres épreuves ont été décrites et proposées comme l'immunodiffusion en gélose et l'inhibition de l'hémagglutination.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : des vaccins vivants atténués (monovalents et polyvalents) destinés au cheval, mulet et âne, sont à l'heure actuelle disponibles dans le commerce. Un vaccin inactivé monovalent a été commercialisé mais n'est plus disponible. De nouveaux vaccins, y compris un vaccin sous-unités, ont été évalués expérimentalement.

A. INTRODUCTION

La peste équine (PE) (*Peste equina africana*, *African horse sickness* [AHS]) est une maladie des équidés non contagieuse, transmise par des arthropodes, due à un *orbivirus* (ARN double brin) de la famille des *Reoviridae*. Le genre *Orbivirus* comprend aussi le virus de la fièvre catarrhale ovine et celui de la maladie hémorragique épizootique qui ont des aspects morphologiques et des propriétés biochimiques voisines alors qu'ils diffèrent par leurs caractéristiques pathogènes et antigéniques ainsi que par les espèces affectées. La particule virale d'une taille d'environ 70 nm n'est pas enveloppée. Le génome du virus de la peste équine (AHSV, *African Horse Sickness Virus*) est formé de 10 segments double brin d'ARN, qui codent 7 protéines structurales (VP 1-7), la plupart de celles-ci ayant été séquencées pour les sérotypes viraux 4, 6 et 9 (29, 36, 39), et 4 protéines non structurales (NS1, NS2, NS3, NS3A) (11, 19). Les protéines VP2 et VP5 forme la partie externe de la capsid du virion, et les protéines VP3 et VP7 constituent les constituants majeurs de la couche interne de la capsid. Les protéines VP1, VP4 et VP6 sont les constituants mineurs de cette couche interne. Les protéines NS3 sont les secondes protéines virales les plus variables (35) ; les plus variables étant la protéine majeure VP2 de la surface de la capsid. Cette protéine VP2 est aussi responsable des sérotypes viraux et, avec VP5, de l'activité de neutralisation du virus (26). Neuf sérotypes distincts de virus de la PE ont été identifiés par neutralisation virale, mais quelques réactions croisées ont été constatées entre les sérotypes 1 et 2, 3 et 7, 5 et 8, ainsi que 6 et 9, mais aucune réaction croisée avec d'autres orbivirus connus n'a été observée.

La PE demeure enzootique en Afrique sub-saharienne, bien que des poussées occasionnelles aient été enregistrées en Afrique du Nord (1965, 1989-1990), au Moyen Orient (1959-1961), et en Europe (Espagne, 1966, 1987-1990 et Portugal, 1989).

La maladie présente, à la fois une incidence saisonnière (fin de l'été, automne) et cyclique avec des pics épizootiques en Afrique du Sud durant les accès de chaleur (1). La mortalité apparaît en rapport avec les espèces d'équidés affectés et la souche ou le sérotype de virus en cause. Au moins deux vecteurs sont impliqués sur le terrain : *Culicoides imicola* et *C. bolitinos*. Parmi les équidés, le cheval est le plus sensible au virus de la PE, avec un taux de mortalité de 50 à 90 %, suivi par le mulet, avec un taux de mortalité voisin de 50 %. Dans les régions d'enzootie africaines ; l'âne est très résistant et ne fait que des infections sub-cliniques. Cependant, en Europe et dans les pays asiatiques, l'âne se révèle moyennement sensible et la mortalité peut atteindre 10 %. Les zèbres sont aussi très résistants, n'extériorisent aucun signe clinique excepté de la fièvre, mais ils peuvent présenter une virémie prolongée (jusqu'à 40 jours) (4).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Bien que certains signes cliniques et certaines lésions soient très évocateurs, comme par exemple l'œdème de la fosse temporale souvent présent chez les chevaux atteints de forme subaiguë, ces signes cliniques associés à des commémoratifs historiques et des informations épidémiologiques peuvent être suffisant pour tenter le diagnostic. Cependant, d'autres signes et lésions sont moins spécifiques de la PE, et d'autres maladies telles que l'encéphalose équine, l'anémie infectieuse, la pneumonie à morbilivirus, l'artérite virale équine, la babésiose et le purpura hémorragique, peuvent être confondues avec une forme ou l'autre de la PE et doivent être écartées. C'est pourquoi le diagnostic de laboratoire est essentiel pour confirmer le diagnostic clinique.

1. Les formes cliniques de la PE

Il existe 4 formes cliniques classiques de PE : pulmonaire, cardiaque, cardio-pulmonaire ou mixte, et fébrile pure (7).

La forme suraiguë ou pulmonaire, qui a une incubation courte (3 à 5 jours), est caractérisée par une dyspnée sévère et une atteinte respiratoire progressive. Une poussée aiguë fébrile, durant 1 à 2 jours et pouvant atteindre 40 à 41 °C, peut être le seul signe. Le plus souvent elle est suivie par divers degrés de détresse respiratoire – la fréquence respiratoire peut augmenter à 60 ou même 75 respirations/min. Le sujet se tient immobile, les antérieurs écartés, la tête tendue sur l'encolure, les naseaux dilatés. Un jetage abondant est fréquent et une toux spasmodique peut être notée en phase terminale avec un jetage mousseux obstruant les naseaux. La mort survient en général quelques heures après le début des manifestations cliniques, l'animal se noyant littéralement

dans son propre fluide séreux. La forme pulmonaire est habituellement observée chez les animaux très sensibles, infectés par une souche hautement virulente, ou sur des animaux qui ont été soumis à un effort physique durant la phase fébrile. La guérison de cette forme est exceptionnelle, survenant dans moins de 5 % des cas. Cette forme est aussi celle qui est observée en général chez les chiens.

L'incubation de la forme subaiguë, œdémateuse ou cardiaque, varie de 7 à 14 jours, et l'apparition des signes cliniques est marquée par une réaction fébrile (39 à 41 °C) qui dure 3 à 6 jours. Peu après le déclin de la fièvre, des tuméfactions œdémateuses peuvent apparaître. Elles débutent dans la fosse temporale ou supra-orbitaire et sur les paupières, puis, plus tard atteignent les lèvres, les joues, la langue, l'espace inter-mandibulaire et la région laryngée. Les œdèmes sous-cutanés peuvent s'étendre à distance du cou vers la poitrine et, dans les cas sévères, peuvent envahir la cage thoracique et les épaules, mais en général pas les membres postérieurs. En phase terminale, des pétéchies peuvent être constatées dans la conjonctive et sous la face ventrale de la langue. Finalement, l'animal devient agité et peut montrer des signes de coliques avant de mourir d'un arrêt cardiaque. Une difficulté de déglutition en rapport avec une paralysie de l'œsophage est aussi rencontrée. Le taux de mortalité est d'environ 50 % et la mort survient généralement en 4 à 8 jours après l'apparition de la réaction fébrile. Lors de guérison, les œdèmes se résorbent progressivement en 3 à 8 jours. Cette forme clinique est habituellement associée à une infection par une souche virale de basse virulence ou se rencontre sur des sujets immunisés par des souches virales hétérologues, ou apparaît en rapport avec des variations biologiques chez l'animal infecté.

La forme aiguë ou mixte associée à la fois la forme pulmonaire et la forme cardiaque et elle est souvent la forme la plus fréquente chez le cheval et le mulet. La mort survient en 3 à 6 jours après le début de l'hyperthermie, et le taux de mortalité est d'environ 70 %. La maladie peut se manifester de la façon suivante :

- Des signes pulmonaires initiaux relativement modérés sont suivis par l'apparition de tuméfactions œdémateuses importantes de la tête et de l'encolure, la mort résultant d'un arrêt cardiaque.
- Des tuméfactions œdémateuses, typiques de la forme subaiguë, sont suivies par l'apparition soudaine d'une dyspnée et des autres signes cliniques caractéristiques de la forme suraiguë pulmonaire.

La forme fébrile pure est la forme la plus discrète et passe souvent inaperçue dans les foyers. L'incubation varie de 5 à 14 jours débouchant sur une réaction fébrile (39 à 40 °C) de type rémittent, avec une rémission le matin et une exacerbation le soir, durant 5 à 8 jours. Mis à part la réaction fébrile, les autres manifestations sont rares. Les conjonctives peuvent être légèrement congestionnées, le pouls accéléré, et un certain degré d'anorexie et d'abattement peut être noté ainsi qu'un œdème des fosses supra-orbitales. Il n'y a pas de mortalité. Cette forme de maladie est habituellement observée chez les animaux bénéficiant déjà d'une immunité partielle et sur les espèces résistantes, telles que les ânes et les zèbres.

Il n'existe aucune donnée plaçant pour la possibilité d'infection de l'homme par une souche de terrain de virus de la PE, soit à la suite d'un contact avec des animaux infectés naturellement ou expérimentalement, soit au cours de manipulation du virus au laboratoire. Cependant certaines souches vaccinales neurotropes peuvent entraîner des encéphalites et des rétinites chez l'homme, suite à une contamination trans-nasale (28). La transmission expérimentale et naturelle du virus au chien a été rapportée, suite à l'ingestion de viande de cheval infecté (3). Néanmoins, on ne dispose que de peu d'éléments quant à la possibilité d'infection du chien par piqûre d'insecte (34).

2. Isolement et identification de l'agent pathogène

Plusieurs techniques sont déjà disponibles pour l'identification du virus de la PE, allant de l'épreuve immuno-enzymatique de capture (ELISA sandwich indirect) qui est une technique rapide et utilisant des anticorps soit polyclonaux (AcP) soit monoclonaux (AcM), à la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) qui inclue une nouvelle technique de transcription inverse couplée à une PCR (RT-PCR) pour discriminer les 9 sérotypes du virus (31) et en passant par la culture sur cellule et l'inoculation à un souriceau nouveau-né. Si possible, plus d'une épreuve doit être réalisée pour diagnostiquer un foyer de PE, spécialement pour préciser le taux d'atteinte. L'épreuve initiale peut être une épreuve rapide telle que l'ELISA ou la PCR, complétée par l'isolement du virus en culture de cellules. La séroneutralisation virale (SN) permettant l'identification du sérotype, doit être effectuée aussitôt que possible lors d'épizootie afin de pouvoir choisir le vaccin adapté. Par la suite, l'ELISA sera très utile pour le diagnostic de laboratoire.

Aujourd'hui, il n'existe aucune souche virale de référence au niveau international, ni de réactifs de diagnostic de référence, et ni aucune méthodologie normalisée pour l'identification du virus de la PE. Néanmoins un panel de virus a été évalué et des études comparatives entre différents tests ELISA pour l'identification antigénique ont été conduites dans différents laboratoires. Les résultats ont démontré un haut niveau de corrélation, pour la détection antigénique (30) lorsque l'on utilise la méthode ELISA sandwich indirecte (13, 18).

Un élément très important du diagnostic est le choix des prélèvements et les conditions de leur transport au laboratoire.

a) Prélèvements pour isolement du virus

Du sang récolté sur anti-coagulant durant le début de la phase fébrile de la maladie, ainsi que des fragments (2 à 4 g) de rate, poumon et nœuds lymphatiques prélevés sur un animal venant de mourir, constituent les prélèvements de choix du diagnostic. Ils doivent être placés à 4 °C durant le transport et au laboratoire.

b) Culture de cellules

L'isolement direct du virus a été réalisé avec succès sur lignées de cellules de mammifères : cellules de rein de jeunes hamsters (BHK-21), de singe (MS), de rein de singe vert africain (Vero), ainsi que sur des lignées de cellules de moustiques et de *Culicoides*. Les prélèvements de sang recueillis sur un anticoagulant approprié peuvent être utilisés non dilués comme inoculum. Après 15 à 60 min d'adsorption à température ambiante ou à 37 °C, les cellules en culture sont lavées et le milieu d'entretien est ajouté. Il est aussi possible et plus courant de laver le sang, de le lyser et le diluer au 1/10. Cette modalité élimine les anticorps indésirables qui peuvent neutraliser le virus et favorise la libération des virus associés aux membranes cellulaires des globules rouges. Quand des prélèvements tissulaires (rate, poumon, etc.) sont utilisés, une suspension tissulaire à 10 % est préparée dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) ou dans du milieu de culture de cellules, contenant des antibiotiques.

Un effet cytopathogène (ECP) peut apparaître entre 2 et 10 jours en post-infection avec les cellules de mammifère. Trois passages aveugles doivent être réalisés avant de considérer les prélèvements comme négatifs. Sur cellules d'insecte, aucun ECP n'est observé, mais la présence du virus peut être détectée 7 à 10 jours après que les cellules d'insecte infectées soient passées sur cellules de mammifère.

c) Souriceau nouveau-né

Cette méthode d'isolement de l'AHSV nécessite une inoculation intra-cérébrale de deux familles de souriceaux âgés de 1 à 3 jours. Lors de résultats positifs, les animaux présentent des signes nerveux entre 3 et 15 jours après l'inoculation. Les cerveaux des animaux malades peuvent être récoltés, homogénéisés et ré-inoculés par voie intra-cérébrale à au moins 6 souriceaux de 1 à 3 jours. Le second passage doit induire une réduction de la période d'incubation (2 à 5 jours) et 100 % d'infectiosité. Le typage du virus peut être réalisé directement à partir des cerveaux de souris soit par la technique conventionnelle de séro-neutralisation, soit par extraction et séquençage de l'ARN.

d) Méthode immuno-enzymatique sandwich

Au moins deux techniques ELISA sandwich spécifiques de groupe ont été mises au point et appliquées à la détection de l'antigène de l'AHSV à la fois sur des prélèvements de terrain et sur des cultures de cellules infectées au laboratoire (13, 18).

L'une (13), utilise des AcPs et l'autre (18), des AcMs vis-à-vis de l'une des protéines majeures la mieux conservée parmi les sérotypes – la protéine VP7. Les deux méthodes se sont révélées convenables pour le diagnostic de la PE, en raison de leur grande sensibilité et spécificité ainsi que de l'obtention des résultats en seulement 2 à 4 h (30). L'utilisation de l'immunoglobuline IgY dans un ELISA en double sandwich d'anticorps pour la détection de tous les sérotypes de l'AHSV, a aussi été décrite (6).

Les réactifs nécessaires à l'ELISA peuvent être obtenus auprès des Laboratoires de référence de l'OIE pour la peste équine (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*).

• **Ce qui suit est un exemple d'ELISA utilisant des anticorps monoclonaux**

- i) *Phase solide* : adsorber sur les plaques ELISA (par exemple Nunc Maxisorb à haute capacité d'adsorption) un mélange de AcM 5G5 et 3D2 dilué en PBS, pH 7,2 (10 µg/ml). Incuber une nuit à 4 °C ;
- ii) Laver les plaques 5 fois avec de l'eau distillée contenant 0,05 % (v/v) de Tween 20 (solution de lavage). Tapoter délicatement les plaques sur une substance absorbante pour éliminer le liquide résiduel ;
- iii) Saturer les plaques avec du PBS + 1 % de sérum-albumine bovine (SAB), pH 7,2, 200 µl par puits, pendant 1 h à 37 °C ;
- iv) Éliminer la solution de blocage et tapoter délicatement les plaques sur une substance absorbante ;

- v) **Prélèvements à tester** : ajouter les prélèvements à tester (dilutions de 2 en 2 en commençant par les homogénats ou les surnageant de cultures de cellules non dilués) dilués en PBS + 1 % SAB, pH 7,2, 100 µl par puits. Incuber pendant 1 h à 37 °C. (homogénat de rate : homogénéiser environ 2 cm³ [1 g] de rate dans 3 ml de milieu de culture MEM [milieu essentiel minimum]. Centrifuger à 600 g pendant 10 min et récupérer le surnageant) ;
- vi) Laver les plaques comme décrit à l'étape ii) ;
- vii) **Conjugué** : répartir 100 µl par puits de 5G5 AcM marqué à la biotine, dilué au 1/500 en PBS + 1 % de SAB, pH 7,2. Incuber 1 h à 37 °C. Laver les plaques comme décrit à l'étape ii). Ajouter 100 µl par puits d'avidine/peroxidase à la dilution optimale en PBS + 1 % de SAB. Incuber 45 min à la température ambiante ;
- viii) Laver les plaques comme décrit à l'étape ii) ;
- ix) **Substrat** : ajouter 200 µl par puits de solution de substrat (10 ml de DMAB 80,6 mM [diméthyl amino benzaldéhyde] + 10 ml de MBTH 1,56 mM [3-méthyl-2-benzo-thiazolinone hydrazone hydrochlorure] + 5 µl de H₂O₂). Le développement de la couleur est stoppé par addition de 50 µl de H₂SO₄ 3 N, après environ 5 à 10 min (avant que les témoins négatifs commencent à se colorer) ;
- x) Lire les plaques à 600 nm (ou 620 nm) ;
- xi) **Interprétation des résultats** : calculer le seuil critique de la façon suivante : $C + ou - 0,06 = \text{Seuil}$ (où C est la valeur de densité optique [DO] obtenue avec le témoin négatif). Les prélèvements donnant des DO inférieures au seuil sont considérés négatifs. Les prélèvements donnant des DO supérieures de + 0,20 sont considérés positifs. Les échantillons donnant des DO intermédiaires sont douteux et doivent faire l'objet d'une autre technique afin de confirmer les résultats.

e) Réaction d'amplification en chaîne par polymérase

Une technique RT-PCR a été mise au point pour la mise en évidence spécifique du génome viral. Cette épreuve (méthode 1) peut être utilisée pour détecter l'ARN viral dans le sang collecté sur éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), ou dans des tissus équins ou de souris ou dans des cultures cellulaires. Les amorces correspondent aux extrémités 5' (nucléotides 1-21) et 3' (nucléotides 1160-1179) du segment 7 de l'ARN (4, 22, 33, 40) et amplifient le segment 7 en entier. Plus récemment, une nouvelle technique conventionnelle (méthode 2) et une RT-PCR en temps réel (méthode 3) utilisant des amorces d'une région très conservée du même segment 7 de l'ARN viral ont été mises au point afin d'améliorer la sensibilité et la rapidité du diagnostic de la PE (10). Les 3 techniques de RT-PCR peuvent détecter les 9 sérotypes ; elles sont décrites ci-dessous.

• Protocole de la méthode 1 (4)

L'extraction des acides nucléiques à partir de prélèvements de rate, est effectuée de la façon suivante : 1 g du prélèvement tissulaire est homogénéisé dans 1 ml de solution dénaturante (thiocyanate de guanidium 4 M, citrate de sodium 25 mM, 2-mercaptoéthanol 0,1 M, sarcosyl 0,5 %). Après centrifugation, 1 µg d'ARN de levure, 0,1 ml d'acétate de sodium 2 M pH 4, 1 ml de phénol et 0,2 ml d'un mélange (49/1) de chloroforme/alcool isoamylique, sont ajoutés au surnageant. La suspension est agitée vigoureusement et placée sur glace pendant 15 min. Après centrifugation, l'ARN présent dans la phase aqueuse est extrait au phénol, précipité à l'éthanol et repris en eau stérile. Les méthodes de synthèse de l'ADNc et d'amplification en PCR sont appliquées, dans tous les cas, à une température de régénération de 37 °C. Les séquences d'amorces PCR utilisées sont : 5'-GTT-AAA-ATT-CGG-TTA-GGA-TG-3', qui correspond à la polarité de l'ARN messenger et 5'-GTA-AGT-GTA-TTC-GGT-ATT-G-3', qui est complémentaire de la polarité de l'ARN messenger. Le protocole PCR proprement dit comprend 40 cycles (94 °C pendant 1 min, 55 °C durant 1,5 min, 72 °C pendant 2,5 min et 70 °C durant 7 min) puis les tubes PCR sont conservés à 4 °C. L'analyse des produits PCR est conduite par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1,2 % (poids/volume) contenant du bromure d'éthidium. Les prélèvements positifs donneront des bandes de 1179 paires de base.

• Protocole de la méthode 2 (10)

L'extraction de l'ARN double brin peut être réalisée en utilisant le kit commercialisé High Pure Viral Nucleic Acid (Roche Diagnostics), décrit ci-dessous. D'autres kits d'extraction de l'ARN sont disponibles dans le commerce pour la préparation de matrices convenant à la RT-PCR selon l'échantillon à analyser et peuvent être utilisés. Différents échantillons peuvent être soumis à analyse selon cette procédure comme des surnageants de cultures cellulaires, du sang recolté sur EDTA, du sérum ou des tissus homogénéisés.

Le kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche Diagnostics) comprend les réactifs suivants : un tampon de liaison, de l'ARN porteur de Poly (A), la protéinase K, un tampon qui élimine les inhibiteurs, un tampon de lavage et des tubes filtres (high pure filter tubes) et des tubes de collecte.

Pour les échantillons d'organe ou de tissu, il convient de préparer d'abord une suspension homogénéisée au 1/10 dans du PBS, puis de la clarifier par centrifugation à 12 000 *g* pendant 5 min. Extraire l'ARN du surnageant. Parfois, il est recommandé d'analyser en parallèle une dilution au 1/10 du surnageant.

Extraction à partir des échantillons témoins : homogénéiser en diluant au 1/10 le même tissu que celui des échantillons à traiter ; (a) pour le témoin négatif utiliser 200 µl du tissu indemne de virus et (b) pour le témoin positifs, 200 µl d'homogénat de tissu contenant du virus. Traiter les deux témoins en même temps que les échantillons à analyser.

- i) À l'aide d'une pipette, déposer 200 µl d'échantillon dans un microtube à centrifuger de 1,5 ml ;
- ii) Ajouter 200 µl de tampon de liaison supplémenté en poly(A) et 50 µl de protéinase K ; mélanger immédiatement et incubé à 72 °C pendant 10 min ;
- iii) Centrifuger brièvement le microtube pour éliminer les gouttes à l'intérieur du bouchon ;
- iv) Mélanger l'échantillon avec 100 µl de tampon de liaison ; centrifuger brièvement le microtube pour éliminer les gouttes à l'intérieur du bouchon ;
- v) Insérer un tube filtre (high pure filter tube) dans un tube de collecte et pipetter l'échantillon dans le réservoir supérieur ; centrifuger pendant 1 min à 8 000 tr/min (pour les échantillons de sang recommencer la centrifugation si l'échantillon est resté dans le tube filtre) ;
- vi) Éliminer le filtrat et le tube de collecte et placer le tube filtre dans un nouveau tube de collecte ;
- vii) Ajouter 500 µl de tampon d'élimination des inhibiteurs dans le réservoir supérieur et centrifuger pendant 1 min à 8 000 tr/min ;
- viii) Éliminer le filtrat et le tube de collecte et placer le tube filtre dans un nouveau tube de collecte ;
- ix) Ajouter 450 µl de tampon de rinçage dans le réservoir supérieur et centrifuger pendant 1 min à 8 000 tr/min ;
- x) Éliminer le filtrat et le tube de collecte et répéter l'étape de lavage ;
- xi) Éliminer le tube de collecte et placer le tube filtre dans un tube de collecte propre ; centrifuger pendant 10 s à 13 000 tr/min pour éliminer le tampon de rinçage résiduel ;
- xii) Éliminer le tube de collecte et placer le tube filtre dans un microtube à centrifuger de 1,5 ml ;
- xiii) Pour éluer l'ARN, ajouter 50 µl d'eau stérile sans RNase et préchauffée à 70 °C dans le réservoir supérieur et centrifuger pendant 1 min à 8 000 tr/min ;
- xiv) Traiter immédiatement ou conserver à –20 °C pour traitement ultérieur.

• **Solutions mères pour RT-PCR**

- Eau stérile dépourvue de nucléase ;
- Kit *One-step RT-PCR* disponible dans le commerce auprès de *Qiagen*, et qui contient pour la RT et la PCR : les enzymes, le mélange de nucléotide, le tampon avec du chlorure de magnésium et une solution Q ;
- Une enzyme inhibitrice de la RNase disponible dans le commerce auprès de plusieurs fournisseurs ;
- Les amorces à une concentration de 20 pmol/µl. Séquence de l'amorce 1 : 5'-GGC-TCC-AAC-ACT-CAC-AAG-ATG-T-3' (amorce de tête); séquence de l'amorce 2 : 5'-GGC-GGA-TTA-ATA-GGC-TGC-ATA-3' (amorce inverse) ;
- *Tampon de charge concentré 10×* : 0,2 % de xylène cyanol ; 0,2 % de bleu de bromophénol ; 30 % de glycérol ;
- *Tampon TAE (50×* pour gel d'agarose : Tris base (242 g) ; acide acétique glacial (57,1 ml) ; 0,5 M EDTA, pH 8 (100 ml) ; eau distillée (qsp 1 litre) ;
- *Marqueurs ADN* : une échelle de 100 paires de bases est disponible dans le commerce.

• **Épreuve d'amplification par RT-PCR**

- i) Il est recommandé de dénaturer l'ARN viral double brin avant de réaliser la RT-PCR. Préparer le mélange suivant pour chaque échantillon : amorce 1 : 20 pmol/µl (0,5 µl) ; amorce 2 : 20 pmol/µl (0,5 µl) ; 7 µl d'eau stérile sans nucléase ; et 2 µl de la matrice de l'échantillon extrait ;

- ii) Placer les tubes dans le thermocycleur ou la base chauffante et incuber à 95 °C pendant 5 min. Centrifuger brièvement les tubes pour éliminer les gouttelettes accrochées au couvercle et placer immédiatement les tubes sur de la glace ;
- iii) Pour chaque échantillon préparer le mélange réactionnel pour la RT-PCR (décrit ci-dessous) dans un microtube à centrifugation de 1,5 ml. Préparer le mélange réactionnel en quantité suffisante pour l'ensemble des échantillons en prévoyant un supplément équivalent à un échantillon ;
- iv) Eau stérile sans nucléase (3,25 µl), tampon de PCR 5× avec du chlorure de magnésium (5 µl), mélange de dNTP 10 mM (0,5 µl), solution Q 5× (5 µl), inhibiteur de la RNase 20 U/µl (0,25 µl), mélange d'enzymes (1 µl) ;
- v) Ajouter 15 µl du mélange réactionnel pour RT-PCR dans chaque tube de PCR contenant la matrice ARN dénaturée ;
- vi) Inclure un témoin positif (2 µl d'ARN du virus de la PE) et un témoin négatif (2 µl d'eau distillée) dans chaque test de RT-PCR ;
- vii) Placer les tubes dans un thermocycleur automatisé et suivre le programme suivant :
 - Un cycle à 55 °C pendant 30 min ;
 - Un cycle à 95 °C pendant 15 min ;
 - 40 cycles à 94 °C pendant 30 s, 58 °C pendant 30 s et 72 °C pendant 30 s ;
 - Un cycle à 72 °C pendant 7 min ;
 - Maintenir à 4 °C.
- viii) Retirer les tubes de PCR à la fin du programme et ajouter dans chaque tube 2,5 µl de tampon de charge (10×) ;
- ix) Placer tous les échantillons sur un gel d'agarose à 3 % dans du tampon TAE contenant du bromure d'éthidium à la concentration finale de 0,5 µg/ml. Ajouter l'échelle ADN dans des pistes de chaque côté du gel ;
- x) Réaliser l'électrophorèse à un voltage constant entre 150 et 200 volts pendant environ 30 min ;
- xi) *Lecture des résultats* : examiner le gel sous lumière ultra-violette. Une bande discrète apparaît dans un échantillon positif qui doit migrer de façon identique à ce qui se passe dans le témoin positif. Calculer la taille des produits d'amplification dans les échantillons à tester et dans le témoin positif en comparant avec les échelles ADN. Les produits d'amplification du témoin positif ont une taille de 102 paires de bases. Aucune bande ne doit être observée avec le témoin négatif.

• **Protocole de la méthode 3 : RT-PCR en temps réel (10)**

Pour la préparation des échantillons et l'extraction de l'ARN, suivre le même protocole que celui décrit pour la méthode 2 de RT-PCR conventionnelle.

• **Solutions mères pour la RT-PCR**

- i) Eau stérile dépourvue de nucléase ;
- ii) Kit One-step RT-PCR disponible dans le commerce auprès de *Qiagen*, et qui contient les enzymes pour la RT (mélange RT) et la PCR, le mélange de nucléotide et le tampon avec du chlorure de magnésium (mélange primaire) ;
- iii) Une enzyme inhibitrice de la RNase disponible dans le commerce auprès de plusieurs fournisseurs ;
- iv) Utiliser les mêmes amorces que pour la méthode 2 de la RT-PCR conventionnelle décrite plus haut. Les amorces sont à une concentration de 20 pmol/µl. Séquence de l'amorce 1 (sens positif) : 5'-GGC-TCC-AAC-ACT-CAC-AAG-ATG-T-3' ; séquence de l'amorce 2 (sens négatif) : 5'-GGC-GGA-TTA-ATA-GGC-TGC-ATA-3' ;
- v) Sonde fluorogénique TaqMan-MGB® à la concentration de 10 pmol/µl : (5'-[6-carboxy-fluoréscéine (FAM)-TGG-CAC-GCC-TTA-CGC-GC-[MGB - Minor Groove Binder Molecule]-3').

• **Épreuve d'amplification par RT-PCR**

- i) il est recommandé de dénaturer l'ARN viral double brin avant de réaliser la RT-PCR. Préparer le mélange suivant pour chaque échantillon : amorce 1 : 20 pmol/µl (0,75 µl) ; amorce 2 : 20 pmol/µl (0,75 µl) ; 6,5 µl d'eau stérile dépourvue de nucléase ; et 2 µl de la matrice de l'échantillon extrait ;

- ii) Placer les tubes dans le thermocycleur ou la base chauffante et incuber à 95 °C pendant 5 min. Centrifuger brièvement les tubes pour éliminer les gouttelettes accrochées au couvercle et placer immédiatement les tubes sur de la glace ;
- iii) Pour chaque échantillon préparer le mélange réactionnel pour la RT-PCR (décrit ci-dessous) dans un microtube à centrifugation de 1,5 ml. Préparer le mélange réactionnel en quantité suffisante pour l'ensemble des échantillons en prévoyant un supplément équivalent à un échantillon ;
- iv) Eau stérile dépourvue de nucléase (1,375 µl), sonde TaqMan - MGB® 10 pmol/µl (0,625 µl), mélange primaire 2× (12,5 µl), inhibiteur de la RNase 20 U/µl (0,25 µl), mélange pour RT (0,25 µl) ;
- v) Ajouter 15 µl du mélange réactionnel pour RT-PCR dans chaque tube optique pour PCR ou dans chaque puits d'une plaque optique contenant la matrice ARN dénaturée ;
- vi) Inclure un témoin positif (2 µl d'ARN du virus de la PE) et un témoin négatif (2 µl d'eau distillée) dans chaque test de RT-PCR ;
- vii) Placer les tubes dans un thermocycleur automatisé et suivre le programme suivant :
 - Un cycle à 55 °C pendant 30 min.
 - Un cycle à 95 °C pendant 15 min.
 - 45 cycles à 94 °C pendant 15 s, 60 °C pendant 1 min. Faire les mesures de la fluorescence à la fin de chaque cycle à une longueur d'onde appropriée.
- viii) *Lecture des résultats* : déterminer une valeur seuil du cycle (Ct) pour chaque réaction de PCR à partir d'une grille des points d'amplification (un point dû au signal de fluorescence en rapport avec le nombre du cycle). Les échantillons négatifs, les témoins négatifs non infectés ou les témoins « blancs » doivent avoir une valeur Ct > 45,0. Les échantillons à tester positifs et les témoins positifs doivent avoir une valeur Ct < 45,0 (les échantillons fortement positifs ont une valeur Ct < 30).

- **Sérotypage du virus de la peste équine (AHSV)**

Il y a encore peu de temps, la séroneutralisation (SN) était, grâce à des antisérums spécifiques, la méthode de choix pour le sérotypage ainsi que l'épreuve étalon (*gold standard*) pour l'identification des souches de virus isolées sur le terrain (37). Cette technique nécessite au moins 5 jours avant que les résultats ne soient disponibles. La mise au point récente d'une épreuve RT-PCR spécifique de type pouvant servir à l'identification et à la différenciation des 9 sérotypes du virus a fourni une méthode qui confirme en quelques heures l'identité du virus dans les échantillons de tissu (27, 31). Neufs paires d'amorces ont été préparées à partir du segment 2 du génome viral de chaque sérotype. Les résultats obtenus par la RT-PCR sont en concordance parfaite avec ceux de la séroneutralisation.

Le typage des 9 sérotypes du virus équinestique a aussi été réalisé avec des sondes obtenues d'une série de gènes entiers clonés de VP2 et cette technique peut être une alternative à l'amplification du segment génomique 2 (17).

3. Épreuves sérologiques

Des sérums de référence internationale OIE sont disponibles (consulter le site web de l'OIE [www.oie.int] pour l'adresse). Ces sérums ont été produits afin de normaliser l'ELISA, qui est une épreuve prescrite par l'OIE. De plus, un ensemble de sérums de référence a été évalué et des études comparatives entre différentes techniques ELISA utilisant des AcMs et des AcPs, impliquant plusieurs laboratoires, ont été réalisées. Les résultats ont révélé un degré élevé de corrélation en utilisant l'ELISA de compétition ou indirect pour la mise en évidence des anticorps (12, 20, 30). Plus récemment, un ensemble de sérums a été produit et est utilisé aujourd'hui pour les contrôles annuels de qualité de trois épreuves de détection des anticorps par ELISA adoptés par les laboratoires nationaux en Europe (9, 12, 20).

Les épreuves ELISA indirecte ou de compétition utilisant soit l'antigène soluble de l'AHSV soit une protéine VP7 recombinante (12, 20) se sont révélés de bonnes méthodes de détection des anticorps spécifiques de groupe, notamment pour des recherches à grande échelle (30). L'ensemble de ces épreuves a été reconnu par la Commission Européenne (9). L'ELISA de compétition peut aussi être utilisé chez les animaux sauvages puisque les anti-globulines spécifiques d'espèce ne sont pas nécessaires avec cette méthode. Une épreuve d'immuno-empainte a été appliquée à la recherche des anticorps anti-AHSV (20). Elle est particulièrement adaptée à l'étude d'un petit nombre de sérums. Un ELISA indirect utilisant la protéine non structurale NS3 du sérotype 4 comme antigène, est aussi disponible ; il peut être utilisé pour différencier les animaux infectés ou vaccinés avec le vaccin à virus vivant de ceux vaccinés avec le vaccin inactivé préparé à partir de virions purifiés (21). Il convient néanmoins de remarquer qu'aucun vaccin inactivé n'est commercialisé à l'heure actuelle. La réaction de fixation du complément (FC) a été largement utilisée, mais certains sérums se révèlent anti-complémentaires, notamment ceux des ânes et des zèbres.

a) Méthode immuno-enzymatique indirecte (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

La protéine VP7 recombinante a été utilisée comme antigène pour la recherche des anticorps anti-AHSV et a révélé une grande sensibilité et spécificité (20, 38). Les autres avantages de cet antigène résident dans sa stabilité et son innocuité (23).

• **Protocole**

- i) *Phase solide* : fixer sur les plaques ELISA (par exemple des plaques Nunc Maxisorb à haute capacité d'adsorption) le recombinant AHSV-4 VP7 dilué en tampon carbonate/bicarbonate, pH 9,6. Incuber une nuit à 4 °C ;
- ii) Laver les plaques 5 fois à l'eau distillée contenant 0,01 % (v/v) de Tween 20 (solution de lavage). Retourner et tapoter délicatement les plaques sur une substance absorbante pour éliminer le liquide résiduel ;
- iii) Saturer les plaques avec du PBS, pH 7,2 + 5 % (poids/volume) de lait écrémé, 200 µl par puits, pendant 1 h à 37 °C ;
- iv) Éliminer la solution de blocage et tapoter délicatement les plaques sur la substance absorbante ;
- v) *Prélèvements à tester* : les prélèvements de sérum à tester et les sérums témoins positif et négatif sont dilués au 1/25 en PBS + 5 % (poids/volume) de lait écrémé + 0,05 % (v/v) de Tween 20, 100 µl par puits. Incuber durant 1 h à 37 °C. Lors de titrage, ajouter des dilutions en série de raison 2, à partir de la dilution au 1/25 (100 µl/puits), un sérum par colonne, et faire la même chose avec les témoins positif et négatif. Incuber 1 h à 37 °C ;
- vi) Laver les plaques comme décrit à l'étape ii) ;
- vii) *Conjugué* : Répartir 100 µl/puits d'anti-gamma globuline de cheval conjuguée à la peroxydase de raifort, diluée en PBS + 5 % de lait + 0,05 % de Tween 20, pH 7,2. Incuber 1 h à 37 °C ;
- viii) Laver les plaques comme indiqué en ii) ;
- ix) *Substrat* : ajouter 200 µl/puits de solution de substrat (10 ml de DMAB + 10 ml de MBTH + 5 µl de H₂O₂). Le développement de la couleur est stoppé en ajoutant 50 µl de H₂SO₄ 3 N, après environ 5 à 10 min (avant que le témoin négatif ne commence à se colorer). D'autres substrats tels que l'ABTS (acide 2,2'-azino-di-[3-éthyl-benzothiazoline]-6-sulphonique), le TMB (tétraméthyl benzidine) ou l'OPD (orthophényldiamine) peuvent aussi être utilisés ;
- x) Lire les plaques à 600 nm (ou 620 nm) ;
- xi) *Interprétation des résultats* : calculer le seuil critique en ajoutant 0,6 à la valeur obtenue pour le témoin négatif (0,6 est la déviation standard calculée sur un ensemble de 30 sérums négatifs). Les sérums donnant une densité optique (DO) inférieure au seuil sont considérés négatifs ; ceux donnant une DO supérieure de +0,15 sont considérés positifs. Les sérums donnant des DO intermédiaires sont suspects et doivent faire l'objet d'une seconde technique pour confirmer le résultat.

b) Immuno-empreinte (immunoblotting)

La fixation d'anticorps sur des protéines virales séparées par électrophorèse et transférées sur film de nitrocellulose, a été appliquée à la recherche des anticorps anti-AHSV (20).

• **Protocole**

Des protéines de virus équestre semi-purifiées sont séparées par SDS/PAGE (électrophorèse sodium dodecyl sulfate/gel de polyacrylamide) dans des gels à 15 % (poids/volume) de DATD (acrylamide-N,N'-diallyltartar-diamide). Les protéines séparées sont transférées sur une membrane de nitrocellulose sous un courant constant de 280 mA pendant 6 h à 4 °C. L'immuno-empreinte d'une membrane de nitrocellulose découpée en bande est réalisée avec des sérums dilués à 1/20, une immunoglobuline de lapin anti-globuline de cheval conjuguée à la peroxydase à la dilution de 1/500 et un temps d'incubation de 1 h à 37 °C. Les bandes reconnues par les sérums sont développées par la méthode du 4-chloro-naphtanol.

Interprétation des résultats : la comparaison avec les bandes obtenues des sérums témoins positif et négatif permet l'identification des bandes spécifiques du virus. L'apparition d'au moins deux de ces bandes spécifiques avec un sérum posant problème permet de considérer celui-ci comme un sérum positif.

c) NS3 ELISA

Un ELISA indirect permettant de différencier les chevaux infectés des chevaux vaccinés avec un vaccin inactivé purifié de sérotype 4, utilisant un recombinant de la protéine NS3 comme antigène, a été décrit (21). Les résultats obtenus indiquent que le recombinant NS3 permet de bien différencier les animaux infectés de

ceux vaccinés par un vaccin inactivé. De ce fait, ce recombinant peut être un réactif de diagnostic essentiel pouvant autoriser le transport des chevaux vaccinés. Pour assurer la fiabilité des résultats, il est fondamental que le vaccin anti-peste équine inactivé soit un vaccin purifié. Il faut s'assurer de l'absence de traces de NS3 car celles-ci stimuleraient la production d'anticorps anti-NS3 chez les chevaux vaccinés, qui risqueraient d'être considérés comme présentant une réponse à une infection naturelle. Ce type d'ELISA pourrait aussi être utile pour distinguer les chevaux infectés de ceux vaccinés avec un vaccin sous-unités dépourvu de protéine NS3. Il convient néanmoins de remarquer qu'aucun vaccin inactivé n'est commercialisé à l'heure actuelle.

d) Fixation du Complément (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

La fixation du complément (FC) a été largement utilisée, mais en raison du pouvoir anti-complémentaire de certains sérums et des bons résultats donnés par l'ELISA, elle est quelque peu délaissée. La FC est surtout utilisée pour la recherche des anticorps anti-AHSV spécifiques de groupe. Un extrait sucrose/acétone de cerveau de souris est communément utilisé comme antigène.

• Réactifs

- i) Tampon salin véronal contenant 1 % de gélatine (VBSG) ;
- ii) Les sérums, exempts d'érythrocytes, doivent être inactivés par la chaleur : à 56 °C pour le cheval, 60 °C pour le zèbre, 62 °C pour l'âne, pendant 30 min ;
- iii) L'antigène est un extrait sucrose/acétone de cerveau de souris infectée par le virus. Le témoin antigène est du cerveau de souris non infecté extrait de la même façon. En l'absence d'un sérum étalon international, l'antigène doit être titré avec un sérum témoin positif préparé localement. Dans le test, 4 à 8 unités antigéniques sont utilisées ;
- iv) Le complément est un sérum normal de cobaye ;
- v) L'hémolysine est un sérum de lapin anti-globules rouges de mouton (GRMs) ;
- vi) Les GRMs sont obtenus par ponction stérile de la veine jugulaire et conservés en solution d'Alsever¹ ou en citrate de sodium ;
- vii) Le système hémolytique (SH) est préparé en diluant l'hémolysine pour obtenir 2 doses hémolytiques et en utilisant cette dilution pour sensibiliser les GRMs lavées. Les GRMs sont normalisées à une concentration de 3 % ;
- viii) *Sérums témoin* : un sérum témoin positif est obtenu localement et validé. Un sérum provenant d'un cheval en bonne santé et dépourvu d'anticorps est retenu comme témoin négatif.

• Protocole

- i) Les sérums, le complément et l'antigène sont répartis dans des plaques de micro-titrage à fond rond, ou dans des tubes si la macro-technique est choisie, puis incubés à 4 °C pendant 18 h ;
- ii) Les GRMs (3 %) sensibilisés sont ajoutés dans tous les puits de la plaque ;
- iii) La plaque est incubée à 37 °C pendant 30 min ;
- iv) Les plaques sont alors centrifugées à 200 *g*, et les puits sont examinés pour juger de l'hémolyse ;
- v) Les témoins suivants sont utilisés : (a) sérum et complément ; (b) sérum et GRMs ; (c) antigène FC et témoin antigène chacun avec 4 CH₅₀ (50 % unité hémolytique de complément), 2 CH₅₀ et 1 CH₅₀ de complément ; (d) antigène FC et GRMs ; (e) témoin antigène et GRMs ; (f) dilutions de complément de 4 CH₅₀, 2 CH₅₀, et 1 CH₅₀ ; (g) GRMs ;
- vi) Les résultats sont lus en retenant l'hémolyse à 50 % comme seuil. L'inverse de la plus haute dilution de sérum fixant spécifiquement le complément avec l'antigène FC, constitue le titre ;
- vii) Un titre de 1/10 ou plus est considéré positif, négatif si inférieur à 1/10.

e) Séroneutralisation virale

La séroneutralisation du virus permet de détecter les anticorps spécifiques de type (14, 15). Elle présente aussi un intérêt pour la surveillance épidémiologique et les études de transmission, notamment dans les régions d'enzootie où plusieurs sérotypes sont susceptibles de circuler (27).

1 Dextrose : 20,5 g (114 mM) ; citrate de sodium 2H₂O : 7,9 g (27 mM), NaCl : 4,2 g (71 mM) ; H₂O qsp 1 litre. Ajuster le pH avec de l'acide citrique 1 M.

- **Protocole**

- Le virus stock est dilué de façon à obtenir 100 DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) avec un éventail allant de 30 à 300 DICT₅₀ dans 25 µl, et 25 µl sont ajoutés à chacun de 4 puits de plaque de micro-titrage contenant 25 µl de dilutions de sérum. Pour réaliser une épreuve de dépistage, une dilution finale de 1/10 est utilisée. Des dilutions de 2 en 2 sont utilisées pour les titrages.
- Les mélanges sérums/virus sont incubés à 37 °C pendant 60 min avant l'addition de 0,1 ml de suspension de cellules Vero (200 000 cellules/ml) dans chaque puits.
- Un titrage de confirmation du virus stock est préparé pour chaque épreuve en utilisant 4 puits par dilution de 10 en 10, 25 µl par puits. Les plaques sont incubées à 37 °C, 5 % de CO₂, 95 % d'humidité pendant 4 à 5 jours, jusqu'à ce que le titrage de vérification indique que le virus stock contient de 30 à 100 DICT₅₀.
- Les plaques sont alors fixées et colorées par une solution à 0,15 % (poids/volume) de cristal violet dans 2 % (v/v) de glutaraldéhyde, puis sont rincées. En alternative, elles peuvent être fixées à l'éthanol à 70 % et colorées avec de la fuschsine basique à 1 %.
- Le titre au point 50 % du sérum est calculé par la méthode de Spearman-Kärber et exprimé en log₁₀ négatif.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Des vaccins polyvalents ou monovalents vivants atténués de la PE, issus de la sélection en culture de cellules Vero de macro-plaques génétiquement stables, sont disponibles dans le commerce auprès de *Onderstepoort Biological Products*, Onderstepoort, Afrique du Sud (8). Un vaccin monovalent inactivé (anti-sérotypé 4) préparé par purification du virus et inactivation au formol a été produit, mais n'est pas disponible à l'heure actuelle (5, 16). Les exigences à la fois pour les vaccins atténués et inactivés sont résumées ci-dessous.

Les prescriptions pour la production des vaccins à usage vétérinaire sont données au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les instructions données ici et dans le Chapitre 1.1.8. ont une portée générale et peuvent être complétées par des exigences nationales et régionales.

C1. Vaccin équinestique atténué

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Elle est issue de la sélection, en cellules Vero, de grandes plaques génétiquement stables apparues après un petit nombre de passages de l'AHSV. Les mutants « plaque » sont multipliés par 3 passages supplémentaires sur cellules Vero. Une grande quantité de cet antigène est alors lyophilisée et stockée à -20 °C en tant que stock de semence antigène.

b) Méthode de culture

Le virus semence est produit en culture de cellules Vero en flacons roulants.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Le virus semence doit se révéler exempt de virus contaminants, de bactéries et de mycoplasmes, suite à la mise en œuvre des techniques appropriées. L'identité du sérotype doit être confirmée.

2. Méthode de fabrication

En début de fabrication, les antigènes choisis sont produits à partir du stock de semence antigène, en culture soit de cellules BHK-21 soit de cellules Vero. Les antigènes dits « de travail » sont testés pour leur stérilité, pureté et identité ; ils doivent renfermer au moins 1×10^6 unités formant plaque (UFP)/ml de virus infectieux.

Des cultures de cellules Vero ou BHK-21 en flacons roulants sont réalisées en utilisant du sérum bovin traité par des radiations gamma, dans le milieu de culture. Une fois les cultures confluentes, le milieu est éliminé et les cellules sont ensemencées avec les antigènes de travail. Après 1 h, le milieu d'entretien est ajouté aux cultures. L'incubation est poursuivie à 37 °C pendant 2 à 3 jours. Lorsque l'ECP est bien développé, les cellules ainsi que le surnageant sont récoltés. Les produits issus d'un même sérotype sont mélangés et stockés à 4 °C.

3. Contrôles en cours de fabrication

Les récoltes de chaque sérotype subissent individuellement un contrôle de stérilité et un titrage sur cellules Vero en plaques de titrage. Le titre minimum acceptable est de 1×10^6 UFP/ml.

Finalement, deux vaccins quadrivalents sont préparés en mélangeant respectivement des volumes égaux de sérotypes 1, 3, 4, 5 et 2, 6, 7, 8. Par la suite, le sérotype 5 fut retiré de ce vaccin. Un vaccin monovalent peut aussi être préparé. Après addition d'un stabilisant convenable, le vaccin est distribué sous un volume de 1,0 ml en flacon de verre et lyophilisé.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Suite à la lyophilisation, 5 flacons de vaccin, prélevés au hasard, sont contrôlés pour la stérilité par les méthodes reconnues internationalement. Les tests de stérilité et d'absence de contaminations des produits biologiques sont décrits au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

L'innocuité d'un vaccin est déterminée par inoculation du vaccin reconstitué à la souris (0,25 ml par voie intra-péritonéale), au cobaye (1,0 ml par voie intra-péritonéale) et au cheval (5,0 ml par voie sous-cutanée). Tous les animaux sont observés quotidiennement pendant 14 jours. La température rectale du cheval est prise 2 fois par jour pendant 14 jours et ne doit jamais dépasser 39 °C.

c) Activité

L'activité repose grandement sur la concentration virale du vaccin.

La dose immunisante minimum pour chaque sérotype est d'environ 1×10^3 UFP/dose. Le titre infectieux du produit fini est déterminé par titrage sur plaque en culture de cellules Vero et doit être d'au moins 1×10^5 UFP/dose. Le cheval utilisé pour le test d'innocuité est aussi utilisé pour déterminer l'immunogénicité du vaccin.

Des prélèvements de sang sont effectués le jour de la vaccination et 21 jours plus tard ; ils sont soumis à une recherche des anticorps neutralisant pour chacun des sérotypes par l'épreuve de réduction des plages utilisant des dilutions de 2 en 2 du sérum et environ 100 UFP de virus. Le cheval doit donner un titre d'anticorps neutralisants d'au moins 20, vis-à-vis d'au moins trois des quatre sérotypes du vaccin quadrivalent.

d) Durée de l'immunité

La durée de l'immunité n'est pas évaluée pour chaque lot de vaccin, mais l'immunité est connue pour persister au moins 4 ans. Cependant, en raison d'une possible interférence entre les sérotypes dans chacun des vaccins quadrivalents, un rappel annuel est conseillé dans les régions d'enzootie. La vaccination à l'aide du vaccin monovalent induit une immunité valable pour la vie.

e) Stabilité

A l'état lyophilisé, le vaccin garde son activité pendant de nombreuses années quand il est conservé entre 4 et 8 °C. Néanmoins une durée de conservation de 2 ans est normalement donnée.

C2. Vaccin équinestique inactivé

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

La semence primaire est la souche vaccinale atténuée (AHSV sérotype 4) largement utilisée en Afrique et en Europe du Sud (des stocks de semence sont disponibles auprès du Laboratoire de référence OIE [Onderstepoort]). Le virus a subi 10 passages sur cerveau de souriceaux nouveau-nés pour son atténuation, puis 10 nouveaux passages en cultures de cellules BHK-21 en tubes roulants. Il a été purifié par plaques, 3 fois, en culture de cellules Vero, par sélection de grandes plaques (4 à 6 mm) aux dilutions limites. Le produit de la plaque finale a été passé une fois sur cerveau de souriceau nouveau-né et 4 fois en cultures de cellules Vero. Le produit a été lyophilisé et représente le lot de semence primaire du virus.

b) Méthode de culture

Le virus atténué est produit par passage sur culture de cellules BHK-21 en flacons roulants.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

La semence virale doit être reconnue exempte de contaminants viraux, de bactéries et de mycoplasmes par les techniques appropriées. L'identité du sérotype est confirmée par ELISA double sandwich utilisant un AcM.

2. Méthode de fabrication

Le virus est récolté après développement complet de l'ECP. La culture est poursuivie en suspension de cellules dans le milieu de Stocker sans sérum (MEM) à 37 °C. La croissance virale est contrôlée par évaluation de la viabilité cellulaire (ECP), et, quand les conditions optimales sont atteintes, la température de culture du fermenteur est abaissée à 4 °C. La suspension virale est récoltée stérilement.

La suspension filtrée du virus atténué est inactivée au formol à une concentration finale de 1/1 000. La suspension est transférée dans un autre récipient et agitée à 4 °C pendant au moins 10 jours pour s'assurer que la totalité du virus soit inactivée. Des contrôles d'inactivation sont effectués.

Après inactivation, la suspension antigénique est concentrée par ultrafiltration, puis purifiée par précipitation sélective utilisant le complexe d'oxyde d'éthylène et de cations bivalents, selon la technique brevetée.

3. Contrôles en cours de fabrication

Un contrôle d'identité virale par ELISA double sandwich, un titrage du virus sur cellules Vero avant inactivation, une analyse en gradient de sucrose permettant d'estimer la concentration en particules, et des épreuves de stérilité, sont effectués.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et d'absence de contamination par des produits biologiques sont décrits au Chapitre 1.1.9.

b) Innocuité

Des chevaux sensibles à la PE reçoivent par voie intra-musculaire ou sous-cutanée une simple ou une double dose de vaccin. Les températures rectales sont relevées quotidiennement pendant 14 jours et les chevaux sont surveillés cliniquement. Cinq cobayes reçoivent une dose cheval de vaccin par voie intra-musculaire. Les sérums récoltés à J 21 font l'objet d'une recherche d'anticorps par SN.

c) Activité

Le contrôle d'activité est réalisé par épreuve virulente de chevaux vaccinés. Certains sont vaccinés avec une dose, d'autres avec 2 doses. L'épreuve est effectuée par voie intra-veineuse 77 jours après la première injection. Lorsque 2 injections sont pratiquées, la seconde dose est injectée 21 jours après la première.

Des prélèvements de sérums sont effectués le jour de la vaccination, puis 21 jours plus tard, et sont soumis à une recherche d'anticorps neutralisants et de virus.

d) Durée de l'immunité

Aucune épreuve virulente n'a été pratiquée sur le cheval, seules des études sérologiques ont été conduites. Si le taux d'anticorps induit par 2 injections (protocole recommandé sur le terrain) est, 12 mois après la vaccination, équivalent à celui conféré 28 jours après une simple vaccination, les chevaux sont considérés comme protégés. Avec ce principe, la durée de l'immunité est de 1 an, débutant 7 à 10 jours après la première injection. Un rappel annuel est suffisant pour assurer un bon niveau de protection pour les années suivantes. Le protocole de vaccination recommandé par le fabricant est de 2 injections (à 21 jours d'intervalle) et de un rappel 365 jours après la première injection.

e) Stabilité

Dans la mesure où le vaccin inactivé est relativement un nouveau produit, peu de données sont disponibles sur la durée de sa stabilité. Les résultats disponibles montrent que la stabilité dépasse 3 ans.

C3. Vaccin sous-unités équipestique

Les protéines de surface de la capsid VP2 et VP5 et la protéine interne de capsid VP7, issues de simples et de doubles vecteurs d'expression de recombinants baculovirus, ont été utilisées sous différentes combinaisons pour immuniser des chevaux (24). Toutefois, ce vaccin n'est pas commercialisé.

Un vaccin expérimental préparé avec des extraits cellulaires bruts contenant les 3 protéines structurales a permis d'obtenir une réponse immunitaire protectrice complète chez des chevaux éprouvés avec un virus PE virulent (10^6 DICT₅₀). La virémie n'a pas été mise en évidence chez les vaccinés (24). Des analyses supplémentaires de lysats bruts partiellement protecteurs ont révélé que la protéine soluble VP2 seule était capable d'induire des anticorps neutralisants. Il a été possible de définir les sites neutralisants de la protéine virale VP2 pour les sérotypes AHSV 3, 4 et 9 (2, 25, 36) et très récemment, la protection de chevaux immunisés par la protéine recombinante VP2 (AHSV de sérotype 5) adjuvée à la saponine, vis-à-vis d'une épreuve létale a été rapportée (32). Bien que d'autres recherches soient nécessaires pour estimer la durée de l'immunité induite par ces protéines, les données disponibles soulignent l'efficacité de ce candidat vaccin.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BAYLIS M., MELLOR P.S. & MEISWINKEL R. (1999). Horse sickness and ENSO in South Africa. *Nature*, **397**, 574.
2. BENTLEY L., FEHRSEN J., JORDAAN F., HUISMANS H. & DU PLESSIS D. (2000). Identification of antigenic regions on VP2 of African horsesickness virus serotype 3 by using phage-displayed epitope libraries. *J. Gen. Virol.*, **81**, 993–1000.
3. BEVAN L.E.W. (1911). The transmission of African horse sickness in the dog by feeding. *Vet. J.*, **67**, 402–408.
4. BREMER C.W., DUNGU-KIMBENGA B. & VILJOEN G.J. (1998). Detection of African horsesickness virus in Zebra by RT-PCR and the development of different methods for confirming AHSV specificity of RT-PCR products. Proceedings of the Eighth International Conference on Equine Infectious Diseases, Dubai, 23–26 March 1998. R & W Publications (Newmarket) Ltd, Newmarket , UK.
5. DUBOURGET P., PREAUD J., DETRAZ F., LACOSTE F., FABRI A., ERASMUS B. & LOMBARD M. (1992). Development, production, and quality control of an industrial inactivated vaccine against African horse sickness virus serotype 4. In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses: Proceedings of the Second International Symposium, Walton T.E. & Osburn B.I., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 874–886.
6. DU PLESSIS D.H., VAN WYNGAARDT W., ROMITO M., DU PLESSIS M. & MAREE S. (1999). The use of chicken IgY in a double antibody sandwich ELISA for detecting African horsesickness virus. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **66**, 25–28.
7. ERASMUS B.J. (1973). The pathogenesis of African horse sickness. In: Proceedings of the Third International Conference on Equine Infectious Diseases. Karger, Basle, Switzerland.

8. ERASMUS B.J. (1976). A new approach to polyvalent immunisation against African horse sickness. *In: Proceedings of the Fourth International Conference on Equine Infectious Diseases*, Lyon, France, September 1976. Princeton, N.J. Veterinary Publications, USA, 401–403.
9. EUROPEAN COMMISSION (2002). Commission decision of 21 February 2002 amending Annex D to Council Directive 90/426/EEC with regard to the diagnostic tests for African horse sickness. *Off. J. European Communities*, **L53**, 37–42.
10. FERNÁNDEZ J., FERNÁNDEZ-PACHECO P., RODRÍGUEZ B., SOTELO E., ROBLES A., ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2007). New advances in the molecular diagnosis of African Horse Sickness (AHS). *Proceedings of the 13th International Symposium for the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 11–14 November, Melbourne, Australia.
11. GRUBMAN M. & LEWIS S. (1992). Identification and characterisation of the structural and non-structural proteins of African horse sickness virus and determination of the genome coding assignments. *Virology*, **186**, 444–451.
12. HAMBLIN C., GRAHAM S.D., ANDERSON E.C. & CROWTHER J.R. (1990) A competitive ELISA for the detection of group-specific antibodies to African horse sickness virus. *Epidemiol. Infect.*, **104**, 303–312.
13. HAMBLIN C., MERTENS P.P., MELLOR P.S., BURROUGHS J.N. & CROWTHER J.R. (1991). A serogroup specific enzyme-linked immunosorbent assay for the detection and identification of African horse sickness viruses. *J. Virol. Methods*, **31**, 285–292.
14. HAZRATI A. & OZAWA Y. (1965). Serologic studies of African horse sickness virus with emphasis on neutralisation in tissue culture. *Can. J. Comp. Med.*, **29**, 173–178.
15. HOUSE C., MIKICIUK P.E. & BERNINGER M.L. (1990). Laboratory diagnosis of African horse sickness: comparison of serological techniques and evaluation of storage methods of samples for virus isolation. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2**, 44–50.
16. HOUSE J., LOMBARD M., HOUSE C., DUBOURGET P. & MEBUS C. (1992). Efficacy of an inactivated vaccine for African horse sickness serotype 4. *In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses: Proceedings of the Second International Symposium*, Walton T.E. & Osburn B.I., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 891–895.
17. KOEKEMOER M.J.P., POTGIETER A.C., PAWESKA J.T. & VAN DIJK A.A. (2000). Development of probes for typing African horsesickness virus isolates using a complete set of clone VP-2 genes. *J. Virol. Methods*, **88**, 135–144.
18. LAVIADA M.D., BABIN M., DOMINGUEZ J. & SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (1992). Detection of African horse sickness virus in infected spleen by sandwich ELISA using two monoclonal antibodies specific for VP7. *J. Virol. Methods*, **38**, 229–242.
19. LAVIADA M.D., ARIAS M. & SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (1993). Characterization of African horse sickness virus serotype 4-induced polypeptides in Vero cells and their reactivity in Western immunoblotting. *J. Gen. Virol.*, **74**, 81–87.
20. LAVIADA M.D., ROY P. & SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (1992). Adaptation and evaluation of an indirect ELISA and immunoblotting test for African horse sickness antibody detection. *In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses: Proceedings of the Second International Symposium*. Walton T.E. & Osburn B.I., Eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 646–650.
21. LAVIADA M.D., ROY P., SANCHEZ-VIZCAINO J.M. & CASAL I. (1995). The use of African horse sickness virus NS3 protein, expressed in bacteria, as a marker to differentiate infected from vaccinated horses. *Virus Res.*, **38**, 205–218.
22. LAVIADA M.D., SANCHEZ-VIZCAINO J.M., ROY P. & SOBRINO F. (1997). Detection of African horsesickness virus by the polymerase chain reaction. *Invest. Agr. SA.*, **12**, 97–102.
23. MAREE S. & PAWESKA J.T. (2005). Preparation of recombinant African horse sickness virus VP7 antigen via a simple method and validation of a VP7-based indirect ELISA for the detection of group-specific IgG antibodies in horse sera. *J. Virol. Methods*, **125** (1), 55–65.

24. MARTINEZ J., DIAZ-LAVIADA M., ROY P., SANCHEZ C., VELA C., SANCHEZ-VIZCAINO J.M. & CASAL I. (1996). Full protection against AHSV in horses induced by baculovirus-derived AHS virus serotype 4 VP2, VP5 and VP7. *J. Gen. Virol.*, **77**, 1211–1221.
25. MARTINEZ-TORRECUADRADA J., LANGEVELD J., MELOEN R. & CASAL I. (2001). Definition of neutralizing sites on African horse sickness virus serotype 4 VP2 at the level of peptides. *J. Gen. Virol.*, **82**, 2415–2424.
26. MARTINEZ-TORRECUADRADA J., LANGEVELD J., VENTEO A., SANZ A., DALSGAARD K., HALMILTON W., MELOEN R. & CASAL I. (1999). Antigenic profile of Africa horsesickness virus serotype 4 VP5 and identification of a neutralizing epitope shared with Bluetongue virus and Epizootic hemorrhagic disease virus. *Virology*, **257**, 449–459.
27. MELLOR P.S. & HAMBLIN C. (2004). African horse sickness. *Vet. Res.*, **35**, 445–466.
28. MEYDEN C.H. VAN DER ERASMUS B., SWANEPOEL R. & PROZESKY O. (1992). Encephalitis and chorioretinitis associated with neurotropic African horse sickness virus infection in laboratory workers. *S. Afr. Med. J.*, **81**, 451–454.
29. ROY P., HIRASAWA T., FERNANDEZ M., BLINOV V.M. & SANCHEZ-VIZCAINO RODRIGUEZ J.M. (1991). The complete sequence of the group-specific relationship to bluetongue virus. *J. Gen. Virol.*, **72**, 1237–1241.
30. RUBIO C., CUBILLO M.A., HOOGHUIS H., SANCHEZ-VIZCAINO JM., DIAZ-LAVIADA M., PLATEAU E., ZIENTARA S., CRUCIERE C. & HAMBLIN C. (1998). Validation of ELISA for the detection of African horse sickness virus antigens and antibodies. *Arch. Virol. (Suppl.)*, **14**, 311–315.
31. SAILLEAU C., HAMBLIN C., PAWESKA J. & ZIENTARA S. (2000). Identification and differentiation of nine African horse sickness virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. *J. Gen. Virol.*, **81**, 831–837.
32. SCANLEN M., PAWESKA J., VERSCHOOR J. & DIJK A. (2002). The protective efficacy of a recombinant VP2-based African horsesickness subunit vaccine candidate is determined by adjuvant. *Vaccine*, **20**, 1079–1088.
33. STONE-MARSCHAT M., CARVILLE A., SKOWRONEK A. & LAEGREID W.W. (1994). Detection of African horse sickness virus by reverse transcription PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 697–700.
34. THEILER A. (1906). Transmission of horse sickness into dogs. *Rep. Govt. Vet. Bact.*, 160–162.
35. VAN NIEKERT M., VAN STADEN V., VAN DIJK A.A. & HUISMANS H. (2001). Variation of African horsesickness virus nonstructural protein NS3 in southern Africa. *J. Gen. Virol.*, **82**, 149–158.
36. VENTER M., NAPIER G. & HUISMANS H. (2000). Cloning, sequencing and expression of the gene that encodes the major neutralisation-specific antigen of Africa horsesickness virus serotype 9. *J. Virol. Methods*, **86**, 41–53.
37. VERWOERD D.W., HUISMANS H., ERASMUS B.J. (1979). Orbiviruses. In: Comprehensive Virology, Fraenkel-Conrat H., Wagner R.R., eds. Plenum Press, London, UK, Vol. **14**, 285–345.
38. WADE-EVANS A., WOOLHOUSE T., O'HARA R. & HAMBLIN C. (1993). The use of African horse sickness virus VP7 antigen, synthesised in bacteria, and anti-VP7 monoclonal antibodies in a competitive ELISA. *J. Virol. Methods*, **45**, 179–188.
39. WILLIAMS C.F., INOUE T., LUCUS A.M., ZANOTTO P.M. & ROY Y.P. (1998). The complete sequence of four major structural proteins of African horse sickness virus serotype 6: evolutionary relationship within and between the orbivirus. *Virus Res.*, **53**, 53–73.
40. ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S. & CRUCIERE C. (1994). Diagnosis of the African horse sickness virus serotype 4 by a one-tube, one manipulation RT-PCR reaction from infected organs. *J. Virol. Methods*, **46**, 179–188.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la Peste équine (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).

MÉTRITE CONTAGIEUSE ÉQUINE

RÉSUMÉ

*La métrite contagieuse équine est une inflammation de l'endomètre des juments causée par *Taylorella equigenitalis*, qui résulte habituellement en une infertilité temporaire. C'est une infection non systémique dont les effets se limitent à l'appareil reproducteur de la jument.*

*Lorsqu'ils sont présents, les principaux signes cliniques vont d'une légère à une copieuse décharge vaginale mucopurulente et d'une cervicite ou d'une vaginite. La guérison se produit sans séquelle; par contre l'état de porteur asymptomatique prolongé est établi chez une bonne proportion de femelles infectées. *Taylorella equigenitalis* est le plus souvent transmise lors d'un contact sexuel avec un étalon porteur. Ceux-ci sont toujours asymptomatiques et les sites principaux de colonisation de *T. equigenitalis* se retrouvent au niveau des membranes urogénitales (fosse urétrale, sinus urétral, urètre et feuillet pénien). Une hygiène inadéquate pendant le nettoyage ou l'examen génital des chevaux peut aussi être responsable de la transmission de l'infection. Les sites de persistance de *T. equigenitalis* chez la jument sont les membranes urogénitales, principalement la fosse et le sinus clitoridiens et beaucoup moins fréquemment l'utérus. Les poulains nés de juments porteuses peuvent aussi devenir porteurs. Le microorganisme peut infecter les équidés autres que les chevaux, par exemple les ânes.*

*Le nettoyage et la désinfection combinés à des traitements locaux et systémiques aux antibiotiques peuvent éliminer *T. equigenitalis*. La vaccination s'est révélée inefficace. Le principal moyen de contrôle demeure la prévention de la transmission en s'assurant que les étalons et les juments sont indemnes de la bactérie *T. equigenitalis* avant l'accouplement. La détection de l'état de porteur repose sur la culture et l'identification adéquate de *T. equigenitalis* provenant d'écouvillons urogénitaux de juments et d'étalons. Les anticorps sériques anti-*T. equigenitalis* peuvent être détectés chez les juments pendant 3 à 7 semaines après l'infection. Ils peuvent être également mis en évidence chez une jument porteuse occasionnelle mais jamais chez un étalon. La sérologie est utile dans la détection des infections récentes chez la jument, mais pas lors d'infections chroniques ; par contre l'emphasis concernant le contrôle de la maladie devrait être mise sur la détection des porteurs par culture.*

Identification de l'agent pathogène : *les écouvillons doivent être transportés au laboratoire avec précaution pour éviter une perte de viabilité de la bactérie. L'écouvillon doit être plongé dans du milieu Amies au charbon puis transporté au laboratoire au plus tard 48 h suivant sa collecte, de préférence dans des conditions de température contrôlée. La croissance de *T. equigenitalis* prendra probablement au moins 72 h, elle peut même demander jusqu'à 14 jours. Habituellement, elle ne prend que 6 jours à 37 °C sur un milieu enrichi de sang chauffé et sous une atmosphère de 5 à 10 % de CO₂. Un temps d'incubation d'au moins 7 jours est conseillé avant de certifier que les cultures sont négatives à *T. equigenitalis*. Après 72 h sous des conditions de culture appropriées, les colonies peuvent être petites – de 2 à 3 mm de diamètre – brillantes à opaques, de grise à jaunâtre, lisses à contour régulier. *T. equigenitalis* est une bactérie à Gram négatif, petit bâtonnet coccoïde, souvent pléomorphique et de coloration bipolaire. Elle produit une catalase, une phosphatase, et est fortement positive au test à l'oxydase. Cependant, la bactérie est biochimiquement inerte aux autres tests et son identification finale dépend de la caractérisation antigénique de l'isolat à l'aide d'anticorps spécifiques. La croissance fastidieuse de *T. equigenitalis* rend ce microorganisme difficile à isoler. Le testage des étalons avant la période de reproduction ou la détection de l'état de porteur a été utilisé comme examen complémentaire à la culture.*

Récemment, une autre espèce de *Taylorella*, *T. asinigenitalis*, a été isolée d'ânes mâles et d'étalons aux États-Unis d'Amérique et d'étalons en Europe. Cette nouvelle bactérie n'a pas été associée à une quelconque maladie naturelle, mais réside dans l'appareil génital des ânes mâle et peut être transmise aux autres ânes et chevaux durant la reproduction.

Un kit de diagnostic d'agglutination au latex basé sur les anticorps dirigés contre la bactérie *T. equigenitalis* entière tuée peut être utilisé. Sa spécificité pour le microorganisme est la preuve qu'elle ne réagit pas avec d'autres bactéries Gram négatives, oxydase et catalase positives qui pourraient être cultivées du tractus urogénital des chevaux sont essentielles. Des anticorps monoclonaux ont été développés et peuvent être utilisés avec succès pour identifier *T. equigenitalis* et le distinguer des souches de *T. asinigenitalis*.

Épreuves sérologiques : aucune épreuve sérologique décrite jusqu'à présent ne peut détecter seule et efficacement l'infection dans un but de diagnostic et de contrôle de l'infection. Cependant, les épreuves sérologiques peuvent être utilisées comme complément à la culture de *T. equigenitalis* pour le criblage des juments récemment accouplées à un étalon porteur. Par contre la sérologie ne doit pas être utilisée comme substitut à la culture.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : Il n'existe pas de vaccins efficaces protégeant contre la métrite contagieuse équine ou prévenant la colonisation par *T. equigenitalis*.

A. INTRODUCTION

La métrite contagieuse équine a été premièrement décrite au Royaume-Uni (RU) en 1977 (12), ensuite elle a été diagnostiquée dans de nombreux pays dans le monde. Elle a été à l'origine présentée comme une infection caractérisée par une décharge vaginale mucopurulente provenant de l'inflammation de l'endomètre et du cervix, et causant une infertilité temporaire. La nature fastidieuse et la croissance lente de la bactérie, *Taylorella equigenitalis*, a entraîné bien des difficultés lors des tentatives initiales de culture (22), mais la maladie a été reproduite par épreuve expérimentale au niveau de la région clitoridienne avec un isolat bactérien recueilli au laboratoire (21, 23, 27). Sous des conditions de culture appropriées, *T. equigenitalis* peut être isolée d'une décharge vaginale infectée. Les juments peuvent manifester plus d'un épisode de la maladie dans une courte période de temps (32). Les anticorps sériques persistent de 3 à 7 semaines après l'infection, mais souvent ils ne sont pas détectables chez la jument avant 15 à 21 jours après la guérison d'une infection aiguë (14). La plupart des juments guérissent sans complication, mais certaines peuvent devenir des porteuses de *T. equigenitalis* et ce, pour plusieurs mois (21). La colonisation par *T. equigenitalis* est efficacement démontrée par une culture d'écouvillons de la fosse et des sinus clitoridiens, mais la bactérie peut être isolée en culture pure du cervix et de l'endomètre des juments (21). L'état de porteur n'affecte pas toujours la conception (33), et dans ces cas la gestation se poursuit et le poulain s'infecte lors de la naissance au passage dans la voie génitale ; il devient alors un porteur asymptomatique pour de nombreuses années (30). Plusieurs primo-infections à *T. equigenitalis* chez la jument sont subcliniques, et une jument qui retourne en chaleur prématurément après un accouplement avec un étalon porteur possible est un fréquent indicateur d'infection.

Les juments et étalons porteurs sont des réservoirs de *T. equigenitalis*, mais les étalons, car ils se reproduisent avec plusieurs juments, sont les principaux vecteurs de la transmission. Les membranes urogénitales des étalons deviennent contaminées pendant le coït, entraînant un état de porteur qui peut persister pour plusieurs mois ou plusieurs années (25). Un examen non-hygiénique des juments et des lavages non-sanitaires du pénis des étalons peut également contribuer à la transmission du microorganisme. La bactérie *T. equigenitalis* n'est présente dans aucune autre partie du corps du cheval. La plupart des femelles porteuses de *T. equigenitalis* le sont dans la région clitoridienne. La persistance à long terme du microorganisme dans l'utérus est possible mais n'est pas la règle. Pour détecter ces porteurs de *T. equigenitalis*, des écouvillons du cervix et de l'endomètre devraient être pratiqués de façon routinière en plus des échantillons de la région clitoridienne chez toutes les juments. *Taylorella equigenitalis* peut très rarement causer des avortements chez la jument.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

L'infection et la vaccination ne protègent pas totalement (15). La non-persistance des anticorps entraîne un contrôle de l'infection qui dépend entièrement de la prévention de la transmission via la détection de *T. equigenitalis* dans les écouvillons des membranes urogénitales. Malgré les difficultés liées à la culture de *T. equigenitalis*, le criblage des juments et des étalons avant et pendant leur séjour à la station de reproduction a

éliminé, avec succès, la maladie des chevaux de race pure dans les pays ayant un code volontaire d'action. Ceux-ci sont basés sur celui du « *UK's Horserace Betting Levy Board's Code of Practice* » qui est largement adopté par plusieurs pays (16). Ce code est révisé annuellement et modifié si nécessaire ; les recommandations-clés de ce code sont résumées dans les paragraphes suivants.

Au début de la saison de reproduction, des écouvillons sont pratiqués, à deux occasions à moins de 7 jours d'intervalle, sur tous les étalons, y compris ceux qui sont à leur première saison. Ces écouvillons proviennent de l'urètre, de la fosse urétrale, du feuillet pénien et des sinus clitoridiens et du fluide pré-éjaculatoire. Les juments sont classées selon le degré de risque qu'elles représentent, et la fréquence de l'échantillonnage est modifiée en conséquence. Les juments à haut risque sont définies comme suit : (a) celles desquelles *T. equigenitalis* a été isolée (le statut de haut risque demeurera jusqu'à ce que 3 paires d'écouvillons négatifs aient été recueillies à 3 périodes d'œstrus différentes en 2 ans) ; (b) juments qui ont visité des écuries où *T. equigenitalis* a été isolée dans les 12 mois précédents ; (c) les juments qui arrivent du Canada, de France, d'Allemagne, d'Irlande, d'Italie, du Royaume-Uni, et des États-Unis et qui ont eu un accouplement pendant la dernière saison de reproduction avec des étalons résidents à l'extérieur de ces pays ; d) toutes les juments qui ont été dans les pays autres que le Canada, la France, l'Allemagne, l'Irlande, l'Italie, le Royaume-Uni, et les États-Unis d'Amérique depuis les 12 derniers mois. Les juments à faible risque sont toutes les juments qui ne sont pas définies comme étant à risque élevé.

Les étalons à risque élevé sont définis comme suit : (a) les étalons qui n'ont jamais été utilisés pour la reproduction ; (b) les étalons où *T. equigenitalis* a été isolée (le statut à risque élevé demeurera jusqu'à ce qu'un traitement ait été administré et que les écouvillons requis soient devenus négatifs) ; (c) les étalons qui ont visité des écuries où *T. equigenitalis* a été isolée dans les 12 mois précédents ; (d) les étalons qui se sont accouplés à une jument qui n'a pas eu d'écouvillon négatif selon le code de pratique. Les étalons à faible risque sont tous les étalons qui ne sont pas définis comme étant à risque élevé. Il existe un problème potentiel sérieux de métrite contagieuse équine dans ce groupe de chevaux.

Les résultats des tests de laboratoire pour *T. equigenitalis* devraient être entrés sur un certificat officiel approuvé, et celui-ci envoyé aux vétérinaires et aux managers de la station qui supervisent la reproduction des étalons de l'écurie. Le certificat devrait contenir le nom de l'animal, les sites et la date de l'écouvillonnage, le nom du vétérinaire en charge de la prise des écouvillons, l'identité du laboratoire effectuant les tests, la date où les écouvillons ont été reçus et cultivés au laboratoire, et le résultat soit positif ou négatif de chaque écouvillon, ou bien si la culture était contaminée par d'autres bactéries à tel point que le laboratoire ne peut émettre de rapport et demande alors un nouvel échantillonnage.

Les difficultés de culture de *T. equigenitalis* dues à sa croissance lente exigent l'usage d'un système de contrôle de qualité qui devrait être approuvé avant qu'un laboratoire ne soit autorisé à tester officiellement pour la métrite contagieuse équine et à émettre des certificats des résultats obtenus. Les contrôles de qualité devraient être faits par un laboratoire de microbiologie expérimenté, fiable, impartial et autorisé en la matière ; il ne devrait pas être impliqué dans les tests de routine de la métrite contagieuse équine. À intervalle de 6 mois, des écouvillons inoculés de cultures mixtes et désignés pour vérifier la capacité d'un laboratoire à cultiver et identifier *T. equigenitalis* avec contaminants, devraient être envoyés aux laboratoires souhaitant participer à ce test. De plus, les procédures pour rapporter les résultats devraient être évaluées. Une liste des laboratoires qui réussissent avec succès les contrôles de qualité devrait être publiée dans un journal vétérinaire largement lu par les vétérinaires nationaux. Les vétérinaires et managers des écuries de reproduction qui supervisent la saison de reproduction des juments et des étalons ne devraient accepter que les certificats provenant de ces laboratoires certifiés.

Toutes les juments ayant un exsudat vaginal anormal ou ayant un retour en chaleur prématuré, devraient être examinées et considérées comme infectées par *T. equigenitalis* jusqu'à ce que les résultats du laboratoire prouvent le contraire. Les autres agents étiologiques possibles d'endométrite sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus zooepidemicus* et certains types capsulaires de *Klebsiella pneumoniae*. Des écouvillons doivent être analysés pour ces bactéries, et un effort diagnostique devrait être fait pour cultiver et identifier *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* afin d'établir un diagnostic différentiel.

Si des porteurs de *T. equigenitalis* sont détectés, le microorganisme peut être éliminé par un traitement systémique aux antibiotiques combiné à une désinfection des membranes génitales exposées (1). Une attention particulière devrait être portée au nettoyage de la fosse et des sinus clitoridiens de la jument ou la colonisation par *T. equigenitalis* est fréquente chez les animaux porteurs. Un traitement peut prendre plusieurs semaines et peut même devoir être répété chez les juments et les étalons avant que des écouvillonnages intensifs s'avèrent négatifs à la croissance du microorganisme *T. equigenitalis* (13). Un nombre significatif de juments porteuses peuvent être réfractaires à plusieurs séries de traitements. Dans ce cas, un recours à la chirurgie ou à l'ablation des sinus clitoridiens permet l'élimination permanente de l'état de porteur chez ces animaux.

Des mesures de contrôle pour les pays considérés exempts de l'infection par *T. equigenitalis* devraient être basées sur le criblage des animaux avant leur importation et/ou pendant une quarantaine post-importation. Des

écouvillons devraient être alors testés selon le protocole décrit ci-haut pour les populations en période de reproduction.

1. Identification de l'agent pathogène (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Plusieurs bactéries commensales peuvent être présentes sur les membranes urogénitales des chevaux qui peuvent interférer avec la culture de *T. equigenitalis*. Certaines bactéries peuvent être présentes en petit nombre au début mais croître dans l'écouvillon avant sa culture et cacher ainsi la présence de *T. equigenitalis* qui ne peut croître. Les écouvillons doivent être placés dans un milieu de transport contenant du charbon actif, tel le milieu Amies, qui absorbe les sous-produits inhibiteurs du métabolisme bactérien (28). Le nombre de *T. equigenitalis* décline dans les écouvillons avec le temps, et ceci d'autant plus que la température est élevée (24). Les écouvillons doivent être gardés réfrigérés durant le transport et devraient arriver au laboratoire au plus tard 24 à 48 h après leur récolte. Les cultures négatives provenant d'écouvillons ensemencés plus de 48 h après leur collecte ne sont pas fiables. Tout traitement aux antibiotiques devrait cesser au moins 7 jours avant l'écouvillonnage. La présence des antibiotiques peut endommager *T. equigenitalis*, qui peut alors persister dans les membranes urogénitales mais sans pousser sur milieu au laboratoire.

Chaque écouvillon doit être inoculé sur une gélose « chocolat » 5 % (v/v), produite en chauffant un milieu liquide contenant du sang entre 70 et 80 °C pendant 12 min. Après refroidissement entre 45 et 50 °C, le triméthoprim (1 µg/ml), la clindamycine (5 µg/ml), et l'amphotéricine B (5 µg/ml), sont ajoutés au milieu de culture Timoney *et al.* (31). La thymidine, qui inactive le triméthoprim, est présente dans le milieu de culture peptoné, il est alors important d'ajouter 5 % de sang hémolysé de cheval à ce milieu. Le sang hémolysé de cheval contient une phosphorylase qui inactivera la thymidine, permettant alors au triméthoprim d'exercer son effet sélectif. C'est le milieu de préférence pour isoler *T. equigenitalis* ; ce milieu a été utilisé avec succès pour isoler 2 biotypes de cet agent pathogène et pour éliminer la croissance de plusieurs bactéries commensales. Étant donné que des inhibiteurs peuvent prévenir l'isolement de certaines souches de *T. equigenitalis*, les écouvillons devraient aussi être inoculés sur des géloses au sang chocolat 5 % contenant une riche base peptonée additionnée de cystéine (0,83 mM), de sulfite de sodium (1,59 mM) et un fongicide (5 µg/ml d'amphotéricine B). *T. equigenitalis* va croître sur géloses au sang, mais la bactérie est plus tolérante aux conditions adverses si elle pousse sur géloses chocolat tel que décrit ci-dessus. Certains fournisseurs¹ produisent une base d'agar peptonée qui supporte, contrôle de qualité à l'appui, la croissance de *T. equigenitalis*. La qualité de l'agar commercial devrait être confirmée par les utilisateurs au laboratoire. Une importante caractéristique de tout bon agar pour *T. equigenitalis* est l'absence de sucres fermentables. Ceux-ci ne favorisent pas la croissance de *T. equigenitalis*, mais leur fermentation par d'autres bactéries inhibe la croissance de *T. equigenitalis* (4, 15). Un troisième milieu de culture contenant du sulfate de streptomycine (200 µg/ml) est parfois utilisé étant donné que certains isolats de *T. equigenitalis* sont résistants à cette concentration d'antibiotique. Celle-ci est utilisée afin de réduire la croissance de bactéries qui pourraient nuire à la croissance de petites quantités de *T. equigenitalis* (28). Cependant, un biotype sensible à la streptomycine est maintenant la souche la plus communément isolée et elle ne sera pas détectée sur ce milieu ; il devrait, par conséquent, être seulement utilisé en association avec le milieu sans streptomycine. La croissance d'autres bactéries, par exemple *Proteus mirabilis*, peut être cependant si intense que le laboratoire devrait émettre un rapport avec mention d'envahissement de contaminants. À ce moment, d'autres écouvillons devraient être recueillis dans l'espoir que le problème ne se reproduira pas.

Tout milieu de culture préparé devrait passer un contrôle de qualité prouvant sa capacité à supporter la croissance du microorganisme provenant d'un petit inoculum avant son utilisation pour des échantillons suspects. La souche de référence de *T. equigenitalis* doit aussi être cultivée en parallèle avec l'échantillon à tester pour garantir que les conditions de culture sont optimales pour l'isolement du microorganisme.

La croissance lente de *T. equigenitalis* rend son isolement difficile. Le test de reproduction pour les étalons a été utilisé pour augmenter la sensibilité de la détection du statut des porteurs et il sert comme test d'appoint à l'examen de la culture. Le nombre de *Taylorella* retrouvé sur les étalons sains est très faible et peut passer inaperçu avec des écouvillons mis en culture mais les bactéries peuvent être détectées après multiplication chez la jument qui vient d'être saillie. L'usage de ce test après l'accouplement comme moyen de diagnostic peut être très important dans les pays qui sont considérés comme indemnes de la métrite contagieuse équine.

Occasionnellement, les membranes urogénitales des étalons et des juments seront colonisées de façon permanente par une autre bactérie qui interfère avec le diagnostic, et il sera alors nécessaire de tenter son élimination par des lavages et un traitement aux antibiotiques. L'écouvillonnage de *T. equigenitalis* ne devra pas être pratiqué au cours des 7 jours suivant l'arrêt du traitement. L'utilisation du milieu de Timoney (31), décrit ci-dessus devrait permettre de surmonter cette difficulté dans la plupart des cas. Il est important que chaque jour des plaques additionnelles de géloses soient ensemencées avec une culture de *T. equigenitalis* pour vérifier que chaque lot de milieu supporte sa croissance.

¹ Par exemple, Mast Diagnostics, Mast House, Derby Road, Bootle, Merseyside L20 1EA, Royaume-Uni, and Lab M, Tomley House, Wash Lane, Bury BL9 6AU, Royaume-Uni.

Les géloses doivent être incubées entre 35 et 37 °C dans une atmosphère contenant 5 à 10 % (v/v) de CO₂ ou en utilisant une chandelle dans une jarre. Au moins 72 h sont normalement requises avant que les colonies de *T. equigenitalis* deviennent visibles, après ce laps de temps des inspections journalières sont recommandées. La détection visuelle des colonies peut prendre jusqu'à 14 jours (35). Une incubation classique d'au moins 7 jours est recommandée avant de certifier les cultures négatives pour *T. equigenitalis*. Les géloses devraient être examinées pour les contaminants après les dernières 24 h d'incubation. Les colonies de *T. equigenitalis* peuvent être de 2 à 3 mm de diamètre, lisses avec un contour régulier, brillantes et de couleur jaunâtre à grise. Les laboratoires devraient prendre en considération que certains pays requièrent un temps d'incubation plus long comme procédure usuelle et ils devraient alors s'assurer des exigences particulières à l'importation ou indiquer la période d'incubation sur laquelle repose leur jugement.

T. equigenitalis est une bactérie à Gram négatif, non mobile, bâtonnet ou coccobacille souvent pléomorphe (près de 6 µm de longueur) et peut montrer une coloration bipolaire. La bactérie est catalase positive, phosphatase positive, et fortement oxydase positive (voir réf. 5 pour les méthodes d'examen de catalase, phosphatase et de l'oxydase). Cependant, elle est inerte dans les autres tests biochimiques. Si un microorganisme à croissance lente est isolé et qu'il correspond à la description adéquate de morphologie cellulaire et qu'il est fortement oxydase positive, il devrait être testé pour sa réactivité avec des antisérums spécifiques anti- *T. equigenitalis*.

Une variété d'épreuves sérologiques de complexité variable a été développée allant de l'agglutination sur lame à l'immunofluorescence directe ou indirecte. Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients. Un inconvénient de l'épreuve d'agglutination est qu'occasionnellement survient une auto-agglutination des isolats : la culture dans un incubateur à CO₂, au lieu d'une jarre avec chandelle, peut réduire l'auto-agglutination (29). Il a été suggéré que l'immunofluorescence pourrait être utilisée pour identifier les isolats auto-agglutinants, certains laboratoires ont rapporté des réactions croisées avec *Mannheimia haemolytica* mais ceci est très rare. Si une réaction croisée est suspectée, il peut être nécessaire de répéter l'épreuve en utilisant du sérum absorbé (29). L'épreuve d'immunofluorescence peut être améliorée en utilisant des anticorps monoclonaux, qui sont maintenant disponibles².

Les antisérums sont produits par vaccination d'un lapin avec *T. equigenitalis* tué. Un certain nombre de protocoles d'immunisation différents peuvent être employés, comme ceux utilisés pour produire les antisérums pour le typage d'*Escherichia coli* (26), et ceux utilisés pour l'immunisation à l'aide d'un adjuvant, comme l'adjuvant incomplet de Freund. Des anticorps monoclonaux sont commercialement disponibles et donnent un moyen hautement spécifique pour identifier *T. equigenitalis*. Une souche de référence, comme celle du NCTC 11184³, devrait être utilisée pour l'immunisation. Cependant, la considération la plus importante est la spécificité de l'antisérum produit. Il devrait agglutiner *T. equigenitalis*, mais il ne devrait pas agglutiner d'autres bactéries qui pourraient l'être et pourraient être retrouvées sur les membranes urogénitales du cheval, et ce même si elles le sont rarement. En particulier, il ne devrait pas agglutiner aucune bactérie à Gram-négatif et oxydase positive telle *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus equuli*, *Bordetella bronchiseptica* (lesquelles sont étroitement apparentées à *T. equigenitalis* voir réf. 9), et *Pseudomonas aeruginosa*. Récemment une autre espèce de *Taylorella*, *T. asinigenitalis*, a été isolée d'ânes mâles aux USA (17) et d'un étalon en Europe (6). Cette nouvelle bactérie ne provoque pas de maladie, mais réside dans le tractus génital des ânes mâles et peut être transmise aux ânesses et aux juments lors de l'accouplement. De plus, l'apparence des colonies, les caractéristiques de la culture et les résultats des tests biochimiques sont similaires à ceux de *T. equigenitalis*. Il existe également une réaction croisée sérologique entre les deux bactéries. Au « National Veterinary Services Laboratories (NVSL) » à Ames, en Iowa, USA⁴, et au « Veterinary Laboratories Agency (VLA) », Bury St Edmunds, au Royaume-Uni, la différenciation entre *T. asinigenitalis* et *T. equigenitalis* est possible en utilisant une amplification en chaîne par polymérase (PCR).

Un kit de diagnostic d'agglutination au latex pour l'identification antigénique de *T. equigenitalis* est disponible dans le commerce. Il est basé sur des anticorps polyclonaux produits par des méthodes similaires à celles décrites plus haut. Ceci est utilisé couramment par les laboratoires pratiquant des tests de routine pour la confirmation de l'identité des colonies poussant sur milieu sélectif et qui donnent des réactions biochimiques concordantes avec *T. equigenitalis*. Comme *T. equigenitalis* est une bactérie antigéniquement et relativement distincte, et que les rares anticorps causant des réactions croisées sont aisément absorbés pendant la production des réactifs, le test s'est révélée hautement spécifique et sensible. Par contre, il devrait être mentionné qu'il ne pourra peut-être pas différencier les souches de *T. equigenitalis* de celles de *T. asinigenitalis*.

Une méthode PCR a été utilisée pour détecter *T. equigenitalis* et a été comparée à la méthode de culture aux Pays-Bas et au Japon (2, 7, 10). Dans ces études, un taux plus élevé de détection par PCR a été trouvé comparé

2 Institut Pourquier, 326 rue de la Galera, Parc Euromedecine, 34090 Montpellier, France. E-mail: info@institut-pourquier.fr

3 Disponible à la National Collection of Type Cultures, Colindale, London, Royaume-Uni.

4 Pour plus d'informations contacter le NVSL à NVSL, P.O. Box 844, Ames, Iowa 50010, USA. E-mail: NVSL_Concerns@aphis.usda.gov or the VLA at VLA, Rougham Hill, Bury St Edmunds, IP33 2RX, UK. E-mail: bury-st-edmunds@vla.defra.gsi.gov.uk

à la culture, même parmi les chevaux importés d'une source sans preuve précédente d'infection ou de maladie clinique due à *T. equigenitalis*. Les auteurs proposent que l'état de porteur soit plus répandu que précédemment rapporté, et que les récentes découvertes concernant les variations génétiques des souches (8, 18) puissent être liées à des différences de pouvoir pathogène. La PCR a aussi été utilisée au Royaume-Uni (11). Elle était hautement spécifique et était capable de détecter un petit nombre de *T. equigenitalis* malgré la présence d'un grand nombre de bactéries provenant de la flore normale d'un échantillon du tractus urogénital équin. Récemment au Japon, l'application de la PCR dans l'éradication de la métrite contagieuse équine a été évaluée. Il a été démontré que la PCR était plus sensible que la culture pour la détection de *T. equigenitalis* provenant d'écouvillons génitaux de chevaux (2, 3, 19, 20). En 2004-2005, une épreuve de PCR en temps réel a été développée au Royaume-Uni pour utilisation directement sur les échantillons génitaux et comparé à la culture (34). Il n'y avait pas de différence significative entre la PCR et la culture, mais la PCR était plus rapide et permettait, en outre, la différenciation entre *T. equigenitalis* et *T. asinigenitalis*. Cette technique prometteuse a besoin d'être plus profondément évaluée, notamment en ce qui s'agit de la détection des porteurs sains.

2. Épreuves sérologiques

Aucune épreuve sérologique décrite jusqu'à maintenant ne détecte l'infection, par elle-même, de façon fiable pour le diagnostic et le contrôle. Cependant, le test de fixation du complément a été utilisé avec succès comme épreuve adjointe à la culture pour *T. equigenitalis* dans le criblage des juments, entre 21 et 45 jours après la saillie pour détecter un étalon porteur.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Aucun vaccin efficace protégeant contre la métrite contagieuse équine ou prévenant la colonisation par *T. equigenitalis* n'est disponible.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANON (1979). Report of an International CEM meeting. *Vet. Rec.*, **105**, 337–338.
2. ANZAI T., EGUCHI M., SEKIZAKI T., KAMADA M., YAMAMOTO K. & OKUDA T. (1999). Development of a PCR test for rapid diagnosis of contagious equine metritis. *J. Vet. Med. Sci.*, **61**, 1287–1292.
3. ANZAI T., WADA R., OKUDA T. & AOKI T. (2002). Evaluation of the field application of PCR in the eradication of contagious equine metritis from Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **64**, 999–1002.
4. ATHERTON J.G. (1983). Evaluation of selective supplements used in media for the isolation of the causative organism of contagious equine metritis. *Vet. Rec.*, **113**, 299–300.
5. BARROW G.I. & FELTHAM R.K.A. (1993). *Cowan and Steels's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Third Edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
6. BAVERUD V., NYSTROM C. & JOHANSSON K.-E. (2006). Isolation and identification of *Taylorella asinigenitalis* from the genital tract of a stallion, first case of a natural infection. *Vet. Microbiol.*, **116**, 294–300.
7. BLEUMINK-PLUYM N.M.C., HOUWERS D.J., PARLEVLIET J.M. & COLENBRANDER B. (1993). PCR-based detection of CEM agent. *Vet. Rec.*, **133**, 375–376.
8. BLEUMINK-PLUYM N.M.C., TER LAAK E.A. & VAN DER ZEIJST B.A.M. (1990). Epidemiologic study of *Taylorella equigenitalis* strains by field inversion gel electrophoresis of genomic restriction endonuclease fragments. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2012–2016.
9. BLEUMINK-PLUYM N.M.C., VAN DIJK L., VAN VLIET A.H., VAN DER GIESSEN J.W. & VAN DER ZEIJST B.A. (1993). Phylogenetic position of *Taylorella equigenitalis* determined by analysis of amplified 16S ribosomal DNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**, 618–621.
10. BLEUMINK-PLUYM N.M.C., WERDLER M.E.B., HOUWERS D.J., PARLEVLIET J.M., COLENBRANDER B. & VAN DER ZEIJST B.A.M. (1994). Development and evaluation of PCR test for detection of *Taylorella equigenitalis*. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 893–896.

11. CHANTER N., VIGANO F., COLLIN N.C. & MUMFORD J.A. (1998). Use of a PCR assay for *Taylorella equigenitalis* applied to samples from the United Kingdom. *Vet. Rec.*, **143**, 225–227.
12. CROWHURST R.C. (1977). Genital infection in mares. *Vet. Rec.*, **100**, 476.
13. CROWHURST R.C., SIMPSON D.J., GREENWOOD R.E.S. & ELLIS D.R. (1979). Contagious equine metritis. *Vet. Rec.*, **104**, 465.
14. DAWSON F.L.M., BENSEN J.A. & CROXTON-SMITH P. (1978). The course of serum antibody development in two ponies experimentally infected with contagious metritis. *Equine Vet. J.*, **10**, 145–147.
15. FERNIE, BATTY I., WALKER P.D., PLATT H., MACKINTOSH M.E. & SIMPSON D.J. (1980). Observations on vaccine and post-infection immunity in contagious equine metritis. *Res. Vet. Sci.*, **28**, 362–367.
16. HORSERACE BETTING LEVY BOARD (2005). Code of Practice on Contagious Equine Metritis, Equine Viral Arteritis, Equine Herpesvirus, and Guidelines on Strangles. Horserace Betting Levy Board, London, UK. <http://www.hblb.org.uk/hblbweb.nsf/Codes%20of%20Practice%202005.pdf>
17. JANG S.S., DONAHUE J.M., ARATA A.B., GORIS J., HANSEN L.M., EARLEY D.L., VANDAMME P.A., TIMONEY P.J. & HIRSH D.C. (2001). *Taylorella asinigenitalis* sp. nov., a bacterium isolated from the genital tract of male donkeys (*Equus asinus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 971–976.
18. LAPAN G., AWAD-MASALMEH M., HARTIG A. & SILBER R. (1991). Investigations on *Taylorella equigenitalis*; cell wall proteins, DNA fingerprints, plasmids, adhesion and cytotoxicity. *J. Vet. Med. [B]*, **38**, 589–598.
19. MISEREZ R., FREY J., KRAWINKLER M. & NICOLET J. (1996). Identifikation und Diagnostik von *Taylorella equigenitalis* mittels einer DNA-Amplifikationsmethode (PCR). *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **138**, 115–120.
20. MOORE J.E., BUCKLEY T.C., MILLAR B.C., GIBSON P., CANNON G., EGAN C., COSGROVE H., STANBRIDGE S., ANZAI T., MATSUDA M. & MURPHY P.G. (2001). Molecular surveillance of the incidence of *Taylorella equigenitalis* and *Pseudomonas aeruginosa* from horses in Ireland by sequence-specific PCR. *Equine Vet. J.*, **33**, 319–322.
21. PLATT H., ATHERTON J.G., DAWSON F.L.M. & DURRANT D.S. (1978). Developments in contagious equine metritis. *Vet. Rec.*, **102**, 19.
22. PLATT H., ATHERTON J.G., SIMPSON D.J., TAYLOR C.E.D., ROSENTHAL R.O., BROWN D.F.J. & WREGHITT T.G. (1977). Genital infection in mares. *Vet. Rec.*, **101**, 20.
23. ROGERSON B.A., CONDRON R.J., BAKER J. & CRAVEN J.A. (1984). Experimental infection of mares with *Haemophilus equigenitalis*. *Aust. Vet. J.*, **61**, 392–395.
24. SAHU S.P., DARDIRI A.H., ROMMEL F.A. & PIERSON R.E. (1979). Survival of contagious equine metritis bacteria in transport media. *Am. J. Vet. Res.*, **40**, 1040–1042.
25. SCHLUTER H., KULLER H., FREIDREICH U., SELBITZ H., MARWITZ T., BEYER C. & ULLRICH E. (1991). Epizootiology and treatment of contagious equine metritis (CEM), with particular reference to the treatment of infected stallions. *Prakt. Tierarzt.*, **72**, 503–511.
26. SOJKA W.J. (1965). *Escherichia coli* in Domestic Animals and Poultry. *Commonwealth Review Series No.7*.
27. SWANEY L.M. & SAHU S.P. (1978). CEM: bacteriological methods. *Vet. Rec.*, **102**, 43.
28. SWERCZEK T.W. (1978). Inhibition of the CEM organism by the normal flora of the reproductive tract. *Vet. Rec.*, **103**, 125.
29. TER LAAK E.A. & WAGENAARS C.M.F. (1990). Autoagglutination and the specificity of the indirect fluorescent antibody test applied to the identification of *Taylorella equigenitalis*. *Res. Vet. Sci.*, **49**, 117–119.
30. TIMONEY P.J. & POWELL D.G. (1982). Isolation of the contagious equine metritis organism from colts and fillies in the United Kingdom and Ireland. *Vet. Rec.*, **111**, 478–482.
31. TIMONEY P.J., SHIN S.J. & JACOBSON R.H. (1982). Improved selective medium for isolation of the contagious equine metritis organism. *Vet. Rec.*, **111**, 107–108.

32. TIMONEY P.J., WARD J. & KELLY P. (1977). A contagious genital infection of mares. *Vet. Rec.*, **101**, 103.
33. TIMONEY P.J., WARD J. & McARDLE J.F. (1978). CEM and the foaling mare. *Vet. Rec.*, **102**, 246–247.
34. WAKELEY P.R., ERRINGTON J., HANNON S., ROEST H.I.J., CARSON T. HUNT B. & HEATH P. (2006). Development of a real time PCR for the detection of *Taylorella equigenitalis* directly from genital swabs and discrimination from *T. asinigenitalis*. *Vet. Microbiol.*, **118**, 247–254.
35. WARD J., HOURIGAN M., MCGUIRK J. & GOGARTY A. (1984). Incubation times for primary isolation of contagious equine metritis organism. *Vet. Rec.*, **114**, 298.

*

* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la métrite contagieuse équine (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).

DOURINE

RÉSUMÉ

La dourine est une maladie contagieuse chronique ou aiguë des solipèdes reproducteurs qui est transmise directement d'un animal à un autre par le coït. L'agent causal est Trypanosoma equiperdum (Doflein, 1901).

La dourine est la seule trypanosomose qui ne soit pas transmise par un vecteur invertébré. Trypanosoma equiperdum diffère des autres trypanosomes en ce qu'il est d'abord un parasite des tissus qui envahit rarement le sang. Il n'y a pas de réservoir naturel connu du parasite autre que les équidés infectés. Il est présent dans les sécrétions génitales du mâle et de la femelle. La période d'incubation, la gravité et la durée d'évolution de la maladie varient considérablement ; elle est souvent fatale, mais des cas de guérison spontanée peuvent se produire et des porteurs latents existent. Des infections subcliniques existent et les ânes et les mulets, plus résistants que les chevaux, peuvent demeurer des porteurs inapparents. L'infection n'est pas toujours transmise à chaque saillie par un animal infecté. Le rat peut être infecté expérimentalement et utilisé pour entretenir indéfiniment les souches du parasite. Pour le stockage, le mieux est de conserver les souches de Trypanosoma equiperdum en azote liquide.

Les signes cliniques sont marqués par des exacerbations et des rechutes périodiques, se terminant par la mort, parfois par de la paraplégie ou, éventuellement, par la guérison. Tous les symptômes suivants peuvent être observés : fièvre, œdèmes locaux des organes génitaux et des glandes mammaires, éruptions cutanées, incoordination, paralysie faciale, lésions oculaires, anémie et cachexie. Des plaques cutanées œdémateuses, de 5 à 8 cm de diamètre et épaisses de 1 cm sont pathognomoniques.

Identification de l'agent pathogène : *le diagnostic définitif dépend de la constatation des signes cliniques et de l'identification du parasite. Comme cela est rarement possible, le diagnostic repose d'habitude sur les signes cliniques et sur la preuve sérologique apportée par la réaction de fixation du complément (FC).*

Épreuves sérologiques : *les anticorps sont présents chez les animaux infectés qu'ils présentent ou non des signes cliniques. Le test de FC est utilisé pour confirmer l'infection des cas cliniques ou des porteurs latents. Les animaux non infectés, notamment les ânes, donnent souvent des résultats peu clairs. L'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) peut être utilisée pour confirmer l'infection ou résoudre des difficultés posées par des résultats non concluants de la FC. Des épreuves immuno-enzymatiques (ELISA) sont également utilisées.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *il n'existe pas de vaccin. La seule méthode de lutte efficace repose sur l'abattage des animaux infectés. Une bonne hygiène de la monte est essentielle en raison d'une possibilité de transmission de l'infection par tout objet contaminé.*

A. INTRODUCTION

La dourine est une maladie contagieuse chronique ou aiguë des solipèdes reproducteurs qui est transmise directement d'un animal à l'autre pendant la saillie. L'agent causal est *Trypanosoma equiperdum* (Doflein, 1901). La dourine est également connue sous d'autres noms : mal du coït, el dourin, morbo coitale maligno, Beschälseuche, slapsiekte, sluchnaya bolyezn et covering disease (1, 8).

Bien que la maladie ait été connue depuis des temps anciens, sa nature ne fut établie qu'en 1896 lorsque Rouget découvrit des trypanosomes chez des chevaux algériens infectés. La dourine est la seule trypanosomose qui ne soit pas transmise par un vecteur invertébré. *Trypanosoma equiperdum* diffère des autres trypanosomes en ce qu'il est d'abord un parasite des tissus, rarement détecté dans le sang. On ne connaît pas d'autre réservoir naturel du parasite que les équidés infectés.

L'infection est transmise pendant la saillie, le plus souvent de l'étalon à la jument, mais aussi de la jument à l'étalon, du fait de la présence du parasite dans le liquide séminal et les exsudats muqueux du pénis et du fourreau du mâle infecté, ainsi que dans le mucus vaginal de la femelle infectée. Initialement, les parasites sont trouvés à l'état libre sur la surface de la muqueuse ou entre les cellules épithéliales d'un animal nouvellement infecté. L'invasion des tissus s'étend et des macules œdémateuses apparaissent dans le tractus génital. Les parasites peuvent alors passer dans le sang qui les transporte dans d'autres parties du corps. Dans les cas typiques, cette invasion métastatique donne naissance à des plaques cutanées caractéristiques.

La période d'incubation, la gravité et la durée de la maladie varient considérablement. En Afrique du Sud, la maladie est typiquement chronique ; habituellement bénigne, elle peut persister pendant plusieurs années (6). Dans d'autres contrées, comme en Afrique du Nord et en Amérique du Sud, la maladie tend à être plus aiguë, ne durant souvent que de 1 à 2 mois ou, exceptionnellement, 1 semaine. Bien que la dourine soit une maladie mortelle, avec une mortalité moyenne de 50 % (spécialement chez l'étalon), la guérison peut survenir. Des infections subcliniques sont reconnues. Les ânes et les mulets sont plus résistants que les chevaux.

Comme les trypanosomes ne sont pas présents en permanence dans le tractus génital au cours de la maladie, la transmission de l'infection ne se produit pas nécessairement à chaque saillie par un animal infecté. La transmission de l'infection de la jument au poulain peut se faire par des muqueuses, comme la conjonctive. On a montré que le lait de la jument infectée était infectieux. Des animaux autres que les équidés peuvent être infectés expérimentalement. Des souches adaptées au rat peuvent être entretenues indéfiniment ; le sang de rat infecté peut être conservé au froid de façon satisfaisante. Les antigènes pour les épreuves sérologiques sont couramment produits à partir de rats de laboratoire infectés.

La maladie est marquée par des stades d'exacerbation, d'accalmie ou de rechutes, qui varient en durée et qui peuvent apparaître une ou plusieurs fois avant la mort ou la guérison. Les signes les plus fréquemment observés sont l'hyperthermie, une tuméfaction et un œdème local des organes génitaux et des glandes mammaires, des éruptions cutanées œdémateuses, le fléchissement des articulations, une incoordination motrice, une paralysie faciale, des lésions oculaires, de l'anémie et un amaigrissement prononcé. Un signe pathognomonique est la plaque œdémateuse consistant en une lésion cutanée surélevée, atteignant 5 à 8 cm de diamètre et 1 cm d'épaisseur. Ces plaques apparaissent habituellement sur les côtes, quoiqu'elles puissent apparaître aussi ailleurs sur le corps et elles persistent d'ordinaire entre 3 et 7 jours. Elles ne sont pas un signe constant.

Généralement, l'œdème disparaît et réapparaît à intervalles irréguliers. Au cours de chaque période de rémission, on peut observer une augmentation permanente de tissu épaissi et induré de la muqueuse vaginale. Celle-ci peut présenter des macules semi-transparentes développées et épaissies. Des plis de la membrane enflée peuvent faire saillie à travers la vulve. Il n'est pas inhabituel de trouver de l'œdème des glandes mammaires et des tissus adjacents. Une dépigmentation de l'aire génitale, du périnée et de la mamelle peut se produire. Chez l'étalon, le premier signe clinique est une enflure variable englobant le gland et le prépuce. L'œdème s'étend vers l'arrière, au scrotum, aux nœuds lymphatiques inguinaux et au périnée avec une extension vers l'avant le long de la partie inférieure de l'abdomen. Chez les étalons de races lourdes, l'œdème peut s'étendre à l'ensemble de la paroi de l'abdomen.

L'hyperthermie est intermittente, les signes nerveux comprennent l'incoordination motrice ; surtout des membres postérieurs, des lèvres, des naseaux, des oreilles et de la gorge. La paralysie faciale est généralement unilatérale. Dans les cas mortels, la maladie est généralement lente et progressive, avec augmentation de l'anémie et de la cachexie, bien que l'appétit soit conservé presque tout le temps.

À l'autopsie, on trouve des exsudats gélatineux sous la peau. Chez l'étalon, le scrotum, le fourreau et la tunique testiculaire sont épaissis et infiltrés. Dans quelques cas, les testicules sont enrobés dans une masse dure de tissu scléreux et peuvent être méconnaissables. Chez la jument, la vulve, la muqueuse vaginale, l'utérus, la vessie et les glandes mammaires peuvent être épaissis avec infiltration gélatineuse. Les nœuds lymphatiques, particulièrement dans la cavité abdominale, sont hypertrophiés, ramollis et, dans quelques cas, hémorragiques. La moelle épinière des animaux atteints de paraplégie est souvent molle, pulpeuse et décolorée, particulièrement dans les régions lombaire et sacrée.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Un diagnostic définitif dépend de la reconnaissance des signes cliniques et de la mise en évidence du parasite. Celle-ci est rarement possible parce que : a) bien que les signes cliniques et les lésions macroscopiques d'une forme typique de la maladie soient pathognomoniques, elles ne peuvent pas toujours être identifiées avec certitude, spécialement aux stades précoces ou lors de cas latents : elles peuvent être confondues avec d'autres affections comme l'exanthème coïtal (de plus, dans certains pays [p.ex. en Amérique du Sud], les infections à *T. evansi* donnent lieu à des signes cliniques semblables) ; b) les trypanosomes ne sont que rarement présents et sont extrêmement difficiles à trouver, même dans les zones oedématisées, et c) les trypanosomes ne sont présents dans le sang que par éclipses et en petit nombre, ce qui complique leur détection. Pour des raisons inconnues, aucune souche de *T. equiperdum* n'a été isolée dans un quelconque pays du monde depuis 1982 et la plupart des souches actuellement disponibles dans les laboratoires nationaux de diagnostic sont apparentées à *T. evansi* (3).

En pratique, le diagnostic repose sur les caractéristiques cliniques confirmées par la sérologie. Récemment, d'autres approches ont été étudiées et publiées (3).

Chez les animaux infectés, les trypanosomes ne sont présents, en petit nombre, que dans la lymphe et les liquides d'œdème des organes génitaux externes, dans le mucus vaginal et dans le liquide contenu dans les plaques. Ils sont d'ordinaire indétectables dans le sang, mais on peut les trouver dans le mucus urétral ou vaginal récolté par des irrigations ou des raclages préputiaux ou vaginaux 4 à 5 jours après la contamination. Plus tard, les parasites peuvent être trouvés dans les liquides d'œdèmes ou de plaques, notamment peu de temps après leur éruption. La peau de la zone recouvrant la plaque doit être lavée, rasée et séchée, et le liquide qu'elle contient aspiré avec une seringue. Les vaisseaux sanguins doivent être évités. Ce prélèvement à l'état frais obtenu par aspiration est examiné au microscope pour observer la motilité des trypanosomes. Ceux-ci ne sont présents que pendant quelques jours, de telle sorte que les lésions doivent être examinées à plusieurs reprises. Le parasite est rarement trouvé en gouttes épaisses, mais il est parfois détectable par centrifugation du sang et examen à nouveau du plasma centrifugé.

Comme la dourine est la seule trypanosomose à affecter les chevaux en climat tempéré, l'observation de trypanosomes dans des gouttes épaisses suffit pour un diagnostic positif. Dans les pays où existent également le Nagana et le Surra, il est difficile de distinguer microscopiquement *T. equiperdum* (par sa morphologie et sa motilité) des autres membres du sous-genre *Trypanozoon* (*T. evansi*, *T. brucei*). En particulier, *T. equiperdum* et *T. evansi* ne peuvent être différenciés sur la base de critères morphologiques. Tous deux sont monomorphes, ont des trypomastigotes allongés avec un flagelle libre, bien que des formes pléomorphes, protéonucléées et trapues soient parfois reconnues. Néanmoins, chez les souches à kinétoplaste, la présence de maxi-cercles chez *T. equiperdum* et leur absence chez *T. evansi* permettent une éventuelle différenciation (14).

Les souches typiques du parasite ont des longueurs allant de 15,6 à 31,3 µm.

2. Épreuves sérologiques

Les anticorps humoraux sont présents chez les animaux infectés, qu'ils manifestent ou non des signes cliniques. La réaction de fixation du complément (FC) (12) est utilisée pour confirmer le diagnostic clinique et pour détecter les infections latentes. Les équidés non infectés, en particulier les ânes et les mulets, donnent souvent des réactions peu interprétables ou non spécifiques en raison des effets anti-complémentaires de leurs sérums. Dans le cas de sérums anti-complémentaires, l'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) est préférable à la FC. Il n'y a pas de protocole adopté au plan international. Dans certains pays, des réactions croisées sont possibles dues à la présence d'autres trypanosomes, par exemple, *T. cruzi* et *T. evansi*. Les épreuves immuno-enzymatiques (ELISA) sont également utilisées. *Trypanosoma equiperdum* est étroitement apparenté à d'autres trypanosomes du Vieux Monde, y compris *T. brucei* et *T. evansi*. Les membres de ce genre *Trypanosoma* partagent tous des éléments conservés de leur cytosquelette commun qui provoquent une forte réponse sérologique croisée. Tous les antigènes et les antisérums (monoclonaux et polyclonaux) actuellement disponibles pour utilisation dans les tests de diagnostic sérologique contiennent ces éléments qu'ils ont conservés ou les anticorps dirigés contre eux. C'est pourquoi aucune des techniques sérologiques décrites ci-dessous n'est spécifique de la dourine. Le diagnostic de la dourine doit reposer sur l'anamnèse, la clinique et le résultat des examens anatomo-pathologiques aussi bien que sur la sérologie. Des améliorations significatives dans le sérodiagnostic de la dourine exigeront la mise au point de sous-unités antigéniques plus spécifiques des trypanosomes et des anticorps correspondants.

a) Test de Fixation du Complément (Épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Des techniques normalisées ou des microplaques peuvent être utilisées (7). Le sérum de cobaye (disponible commercialement) est utilisé comme source de complément. Les autres réactifs sont des

globules rouges de mouton (GRM) lavés en tampon véronal et le sérum hémolytique de lapin (c'est-à-dire sérum de lapin anti-GRM) (commercial), ainsi que des sérums témoins négatif et positif déterminés comme tels.

- **Production de l'antigène**

- i) Un rat est inoculé avec une souche stock de *T. equiperdum* conservé par congélation. Le rat doit être indemne de *T. lewisi*, ce qui peut être obtenu par injection de néoarsphénamine, ou mieux encore en utilisant un rat provenant d'un élevage d'animaux de laboratoire indemne de germes pathogènes (SPF). Les rats adultes reçoivent par voie intra-musculaire ou intra-péritonéale 0,5 à 1 ml d'un stabilat congelé et rapidement décongelé. À l'acmé de la parasitémie, le sang est recueilli sous anti-coagulant, ce qui servira comme culture stock pour l'inoculation d'autres rats.
- ii) 20 gros rats sont inoculés par voie intra-musculaire ou intra-péritonéale avec 0,5 à 1 ml de la culture stock. Tous les rats doivent avoir ensemble une forte infection. Si nécessaire, la dose est ajustée et des rats supplémentaires sont inoculés pour atteindre une parasitémie maximale au bout de la période désirée, à savoir 72 à 96 h. D'ordinaire, les rats meurent dans les 3 à 5 jours ; avant leur mort, le sang est prélevé à la queue pour examen microscopique en goutte épaisse. Quand la parasitémie est maximale, les rats sont euthanasiés et le sang est recueilli en soluté physiologique avec acide citrique et dextrose (ACD) ou en solution d'Alsever. Si la parasitémie n'est pas synchrone, le sang des rats peut être conservé en solution ACD ou d'Alsever à 4 °C jusqu'à ce que les sangs de tous les rats aient été récoltés.
- iii) Le sang est filtré sur gaze de mousseline et centrifugé à 800 *g* pendant 4 min. La plupart des GRM se déposent alors que les trypanosomes demeurent en suspension.
- iv) Le liquide surnageant est transféré dans un tube propre, la couche supérieure des GRM est mélangée aux trypanosomes dans un second tube et la couche qui reste dans un troisième. De la solution ACD ou d'Alsever est ajoutée aux tubes 2 et 3 pour empêcher l'agglomération des cellules. Tous les tubes sont mélangés et centrifugés à 1 500 *g* pendant 5 min.
- v) Le liquide surnageant est éliminé et la couche blanche supérieure des trypanosomes est transférée de ces tubes dans un tube propre. La couche du dessous, de couleur rose, est transférée dans un second tube et la couche inférieure dans un troisième tube.
- vi) Du soluté physiologique est ajouté et mélangé et les tubes sont encore centrifugés à 1 500 *g* pendant 5 min pour séparer les trypanosomes. Cette étape de lavage est répétée jusqu'à ce que tous les trypanosomes soient collectés pour former une masse blanche pure. 10 rats doivent fournir 3 à 5 g d'antigène. Ce procédé de purification peut aussi être réalisé en utilisant une colonne de DEAE (diéthylaminoéthyl) cellulose en solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) contenant du glucose, à pH 8 (11).
- vii) Ce concentré de trypanosomes est dilué dans deux volumes de tampon véronal et 5 % de polyvinylpyrrolidone comme cryoprotecteur. Avant utilisation dans les tests de FC, l'antigène doit être dispersé en une fine suspension avec un homogénéiseur broyeur à billes de verre, à main ou à moteur, refroidi dans la glace (15). Cet antigène peut être divisé en fractions aliquotes, congelé et lyophilisé.

L'antigène est normalisé par titrage contre une dilution à 1/5 d'un antisérum de faible titre.

Sérums : les sérums positifs et négatifs doivent être inactivés à 58 °C pendant 30 min avant d'être utilisés dans les tests. Les sérums de mulets et d'ânes sont normalement inactivés à 62 °C pendant 30 min. Le protocole de la fixation du complément de l'USDA recommande une inactivation des sérums pendant 35 min (13). Les dilutions de sérums qui sont positives dans les épreuves de dépistage sont titrées contre 2 unités d'antigène. Les sérums testés sont triés à une dilution de 1/5. Les sérums montrant plus de 50 % de FC à cette dilution sont d'ordinaire considérés comme positifs.

Sérums anti-complémentaires : si le témoin anti-complémentaire ne présente qu'une trace d'activité anti-complémentaire, celle-ci peut être ignorée. Pour tous les autres sérums anti-complémentaires, leur activité doit être titrée. On fait une série dupliquée de dilutions et le prélèvement est retesté en utilisant l'antigène de *T. equiperdum* dans la première rangée de la série et seulement le tampon véronal dans la seconde. La seconde rangée donne le titre de la réaction anti-complémentaire. À condition que la première rangée donne un point final d'au moins 3 dilutions plus grandes que la seconde, l'effet anti-complémentaire peut être ignoré et le prélèvement noté comme positif. Si les résultats sont plus serrés, un nouveau prélèvement de sérum doit être demandé. Une dilution de sérum de 1/2 et une inactivation par la chaleur à 60-63 °C peuvent conduire à la réduction ou à l'élimination de l'effet anti-complémentaire.

Tampons et réactifs : le soluté physiologique tampon véronal de 0,15 M à pH 7,4 est utilisé pour diluer les réactifs et laver les GRM. L'antigène est prétesté par titrage en échiquier et 2 unités sont utilisées dans le

test. Le complément (C) de cobaye est testé pour son activité hémolytique et dilué pour fournir 2 unités pour le test. Les GRM en solution sont lavés 3 fois en solution ADC ou d'Alsever. Une solution à 3 % est utilisée pour le système hémolytique. Le protocole de l'USDA recommande une solution à 2 % pour la technique de microtitrage avec confirmation dans un tube avec 3 % de GRM. Le sérum titré hémolytique de lapin anti-GRM est utilisé au double de son titre hémolytique (2 unités). Tous les sérums du test, y compris les sérums témoins positifs et négatifs, sont inactivés à une dilution de 1/5 avant le test.

- **Dilutions primaires**

- 100 µl de sérum à tester sont dilués dans 400 µl de tampon véronal (1/5) ;
- 100 µl des sérums témoins positif et négatif sont dilués dans 400 µl de tampon véronal (1/5) ;
- Les solutions sont incubées dans un bain-marie à 58 °C pendant 30 min pour inactiver le complément et détruire les facteurs anti-complémentaires.

- **Protocole pour l'épreuve de dépistage**

- 25 µl du sérum à tester inactivé sont distribués dans chacun des 3 puits ;
- 25 µl de sérum témoin inactivé sont distribués dans chacun des 3 puits ;
- 25 µl de l'antigène de *T. equiperdum* dilué de façon à contenir 2 unités sont seulement versés dans le premier puits pour chaque sérum ;
- 25 µl de complément dilué de façon à contenir 2 unités sont ajoutés aux deux premiers puits seulement pour chaque sérum ;
- 25 µl de tampon véronal, pH 7,4 sont ajoutés au second puits pour chaque sérum (puits anti-complémentaire) ;
- 50 µl de tampon véronal, pH 7,4 sont ajoutés au troisième puits pour chaque sérum (puits d'activité de la lyse) ;
- Le témoin complément est préparé ;
- La plaque est agitée sur un mini-agitateur, suffisamment pour mélanger les réactifs ;
- La plaque est incubée pendant 1 h dans un bain-marie, une étuve ou une chambre humide à 37 °C ;
- Le système hémolytique est préparé. Après les 50 premières minutes d'incubation, les GRM sont sensibilisés en mélangeant des volumes égaux de sérum hémolytique de lapin, dilué de façon à contenir 2 unités par 50 µl, et une suspension à 3 % de GRM lavés, la solution est bien mélangée et incubée pendant 10 min à 37 °C ;
- Après incubation, 50 µl du système hémolytique sont ajoutés à chaque puits ;
- La plaque est agitée suffisamment sur un mini-agitateur pour mélanger les réactifs ;
- La plaque est incubée pendant 30 min à 37 °C ; Pour faciliter la lecture des résultats, il est possible de centrifuger les plaques après incubation ;
- Lecture des résultats** : la plaque est regardée par en-dessus avec une source lumineuse proche. La fixation dans chaque puits est déterminée par estimation de la proportion des cellules non lysées. Le degré de fixation est exprimé en 0, 1+, 2+, 3+, 4+ (0 %, 25 %, 50 %, 75 % ou 100 % des cellules non lysées). Les réactions sont interprétées comme suit : 4+, 3+, 2+ = positives, 1+ = suspectes, trace = négatives, hémolyse complète = négatives.
- Point limite de positivité** : tous les sérums avec des réactions positives au 1/5 sont dilués en double série et testés selon la méthode précédente pour leur point limite de positivité.

b) Épreuve d'immunofluorescence indirecte

Une épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) peut aussi être utilisée pour le diagnostic de la dourine (12) comme épreuve de confirmation ou pour résoudre des résultats non concluants obtenus par le test de FC. Cette épreuve est réalisée comme suit :

Antigène : (pour la méthode à employer : voir la préparation de l'antigène pour le test de FC dans la Section B.2 a). Le sang est recueilli dans des vacutainers héparinés ou dans une solution d'acide-citrate-dextrose à partir d'un animal chez lequel le nombre de trypanosomes est encore en augmentation (il doit y avoir environ 10 parasites par 10 champs microscopiques).

- i) Le sang est centrifugé pendant 10 min à 800 *g*.
- ii) 1 à 2 volumes de PBS sont ajoutés au dépôt de GRM, le mélange est agité et l'on fait des frottis qui recouvrent toute la lame.
- iii) Les frottis sont séchés à l'air et enveloppés par paquets de quatre, avec du papier pour séparer chaque lame. Les paquets de lames sont enveloppés dans des feuilles d'aluminium, scellés dans un conteneur à l'abri de l'air sous gel de silice et conservés à –20 °C ou –76 °C.
- iv) Les lames conservées à –20 °C doivent garder leur activité pendant environ 1 an, celles conservées à –76 °C peuvent demeurer utilisables plus longtemps.

Solution d'acide-citrate-dextrose : utiliser 15 ml par 100 ml de sang.

Conjugué : immunoglobulines de mouton anti-cheval marquées à la fluorescéine.

• **Protocole**

- i) Les lames d'antigène doivent revenir à la température du laboratoire dans un dessiccateur. Une autre technique consiste à retirer les lames du congélateur et à les fixer immédiatement dans l'acétone pour 15 min ;
- ii) Les lames sont marquées ;
- iii) Des gouttes épaisses de sérum à tester diluées en PBS sont déposées sur des lames qui sont alors incubées dans une chambre humide au bain-marie à 37 °C pendant 30 min ;
- iv) Les lames sont lavées dans du PBS, pH 7,2 ; 3 fois pendant 5 min à chaque fois et séchées à l'air ;
- v) Le conjugué marqué à la fluorescéine est ajouté à une dilution correcte. Des lots individuels d'antigène et de conjugué doivent être titrés chacun l'un contre l'autre en utilisant les sérums témoins pour optimiser la dilution du conjugué. Les lames sont incubées dans une chambre humide au bain-marie à 37 °C pendant 30 min ;
- vi) Les lames sont lavées en PBS, 3 fois pendant 5 min chacune et séchées à l'air ; pour réduire la fluorescence non spécifique, il est aussi possible de réaliser une contre-coloration avec du bleu d'Evans (0,01 % dans de l'eau distillée) pendant 1 min, de rincer avec du tampon phosphate (PBS) et de sécher à l'air ;
- vii) Les lames sont montées dans un mélange glycérol/PBS (50/50) ou sous huile à immersion (disponible dans le commerce, qualité « non fluorescente ») ;
- viii) Les lames sont alors examinées en éclairage UV. Un éclairage en lumière incidente est utilisé avec un filtre barrière K 530 et un filtre exciteur BG 12. Les lames peuvent être conservées à 4 °C pendant 4 à 5 jours. Les sérums à tester dilués au 1/80 et au-dessus montrant une forte fluorescence des parasites sont généralement considérés comme positifs. L'estimation de l'intensité de la fluorescence demande de l'expérience de la part de l'observateur.

Les sérums témoins positifs et négatifs de référence doivent être inclus dans chaque lot de tests et une considération particulière doit être accordée au mode de fluorescence de ces témoins quand on apprécie les résultats des sérums à tester.

c) Méthode immuno-enzymatique

Une épreuve immuno-enzymatique (ELISA) a été développée et comparée avec d'autres épreuves sérologiques pour la dourine (14, 16).

Tampon carbonate, pH 9,6, pour enrobage de l'antigène sur les plaques à microtitrage : Na₂CO₃ (1,59 g), NaHCO₃ (2,93 g) et eau distillée (1 litre).

Tampon de blocage : tampon carbonate + 3 % de sérum fœtal de veau (FCS).

PBS, pH 7,4, avec Tween 20 (PBST) pour lavage : KH₂PO₄ (0,2 g) ; Na₂HPO₄ × 12 H₂O (2,94 g) ; NaCl (8,0 g) ; KCl (0,2 g dans 1 litre d'eau distillée) et Tween 20 (0,5 ml).

Prélèvement et tampon conjugué : PBST + 6 % FCS.

Tampon citrique phosphate : acide citrique monohydraté (4,2 g dans 200 ml d'eau distillée) ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ (dans 200 ml d'eau distillée). Les deux composants sont mélangés à volumes égaux.

Substrat indicateur : l'ABTS (2,2'-azino-bis-[3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acide]) (40 mg) est dissout dans le tampon citrique phosphate (100 ml) et conservé à 4 °C à l'abri de la lumière. Juste avant l'emploi, 100 µl de H_2O_2 à 1/40 sont ajoutés à 10 ml d'ABTS.

Conjugué : PO de lapin anti-IgG de cheval (H + L) ou IgY anti-cheval Ig-PO.

Antigène : l'antigène de *T. equiperdum* lyophilisé (0,5 ml) est reconstitué avec un tampon d'enrobage (5 ml), soumis aux ultrasons 2 fois pendant 10 s à chaque fois à 12 µm de pic à pic et centrifugé à 10 000 g pendant 4 min. Le surnageant est ensuite dilué à une dilution prétestée pour essai (par exemple à 1/500).

• Protocole

- i) Les puits dans les colonnes 2, 4, 6, etc. sont chargés de 50 µl d'antigène, ceux des colonnes 1, 3, 5, etc. sont chargés de la même quantité de tampon carbonate. La plaque est incubée pendant 40 min à 37 °C dans une chambre humide, lavée à l'eau du robinet, et 50 µl de tampon de blocage sont ajoutés à chaque puits. La plaque est incubée pendant 20 min, lavée à l'eau du robinet, suivie de 3 cycles de lavage au PBST à raison de 3 min par cycle.
- ii) 50 µl de prélèvements de sérum à tester et de sérum témoin de cheval prédilué à 1/100 en tampon conjugué/prélèvement sont ajoutés en parallèle aux puits avec et sans antigène. La plaque est incubée pendant 30 min, lavée à l'eau du robinet, suivie de 3 cycles de lavage au PBST.
- iii) Le conjugué convenablement dilué en tampon prélèvement/conjugué est ajouté à tous les puits en volumes de 50 µl. La plaque est incubée pendant 30 min avec lavage consécutif comme précédemment.
- iv) 100 µl du système substrat indicateur est ajouté à tous les puits.
- v) La réaction à la température du laboratoire est arrêtée au bout de 15 min par addition de 25 µl de 37 mM de NaCN. Alternativement, des détergents du commerce peuvent être utilisés après pré-testage. Les résultats sont lus par photométrie à une longueur d'onde de 405 nm.
- vi) **Calcul des résultats :** l'absorption (avec l'antigène) moins l'absorption (sans l'antigène) = extinction nette. Une réaction excédant une extinction nette de 0,3 est considérée comme un résultat positif.

Un ELISA de compétition a également été décrit pour détecter les anticorps contre *Trypanosoma equiperdum* (10).

d) Autres épreuves sérologiques

D'autres épreuves sérologiques ont été utilisées dont l'épreuve radio-immune, l'immuno-électrophorèse et l'immunodiffusion en gélose (IDG) (2, 5). L'IDG a été utilisée pour confirmer des résultats positifs et pour tester des sérums anti-complémentaires. Un mode opératoire en 7 puits en agarose à 8 % en tris tampon est utilisé, avec l'antigène de la FC dans le puits central et les sérums témoins positifs et inconnus en alternance dans les puits périphériques. Une méthode utilisant l'immunoblot (9) a été publiée pour diagnostiquer en même temps la piroplasme équine, la morve et la dourine. Un test d'agglutination sur carte a été développé qui peut se comparer favorablement à la FC (4).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'y a pas de produits biologiques actuellement disponibles. La lutte contre la maladie dépend de sa déclaration obligatoire et de l'abattage des animaux infectés. Une bonne hygiène de la monte est également essentielle.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BARNER R.D. (1963). Protozoal diseases. In: Equine Medicine and Surgery, Bone J.F. *et al.*, eds. American Veterinary Publications, Santa Barbara, California, USA, 205–210.

2. CAPOREALE V.P., BIANCIFIORI F., DI MATTEO A., NANNINI D. & URBANI G. (1981). Comparison of various tests for the serological diagnosis of *Trypanosoma equiperdum* infection in the horse. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **4**, 243–246.
3. CLAES F., AGBO E.C., RADWANSKA M., TE PAS M.F., BALTZ T., DE WAAL D.T., GODDEERIS B.M., CLAASSEN E. & BUSCHER P. (2003). How does *T. equiperdum* fit into the Trypanozooan genus? A cluster analysis and multiplex genotyping approach. *Parasitol.*, **126**, 425–431.
4. CLAES F., ILGEKBAYEVA G.D., VERLOO D., SAIDOULDIN T.S., GEERTS S., BUSCHER P. & GODDEERIS B.M. (2005). Comparison of serological tests for equine trypanosomosis in naturally infected horses from Kazakhstan. *Vet. Parasitol.*, **131** (3–4), 221–225.
5. HAGEBOCK J.M., CHIEVES L., FRERICH S.W. & MILLER C.D. (1993). Evaluation of agar gel immunodiffusion and indirect fluorescent antibody assays as supplemental tests for dourine in equids. *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 1201–1208.
6. HENNING M.W. (1955). *Animal Diseases in South Africa*, Third Edition. Central News Agency, South Africa.
7. HERR S., HUCHZERMAYER H.F.K.A., TE BRUGGE L.A., WILLIAMSON C.C., ROOS J.A. & SCHIELE G.J. (1985). The use of a single complement fixation technique in bovine brucellosis, Johne's disease, dourine, equine piroplasmosis and Q fever serology. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **52**, 279–282.
8. HOARE C.A. (1972). *The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph*. Blackwell Scientific Publications, Oxford & Edinburgh, UK.
9. KATZ J.B., CHIEVES L.P., HENNAGER S.G., NICHOLSON J.M., FISHER T.A. & BYERS P.E. (1999). Serodiagnosis of equine piroplasmosis, dourine and glanders using an arrayed immunoblotting method. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 292–294.
10. KATZ J.B., DEWALD R. & NICHOLSON J. (2000). Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum* and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 46–50.
11. LANHAM S.M. & GODFREY D.G. (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.*, **28**, 521–534.
12. MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (1986). *A Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*, Third Edition. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
13. NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES (2006). Complement Fixation Test for Detection of Antibodies to *Trypanosoma equiperdum* – Microtitration Test. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.
14. WASSALL D.A., GREGORY R.J.F. & PHIPPS L.P. (1991). Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of dourine. *Vet. Parasitol.*, **39**, 233–239.
15. WATSON A.E. (1920). *Dourine in Canada 1904–1920. History, Research and Suppression*. Dominion of Canada Department of Agriculture, Health of Animals Branch, Ottawa, Canada.
16. WORKING PROTOCOLS, BgVV: ELISA ON DOURINE (1995). Bundesinstitut f. gesundheitlichen Verbraucherschutz u. Veterinärmedizin (BgVV). P.O. Box 33 00 13, D-14191 Berlin, Germany.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la dourine (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)

LYMPHANGITE ÉPIZOOTIQUE

RÉSUMÉ

*La lymphangite épizootique est une maladie contagieuse et chronique des chevaux et des autres équidés caractérisée, sur le plan clinique, par une dermatite pyogranulomateuse suppurative ulcéralente et envahissante et par une lymphangite. Ces lésions prédominent au niveau de l'encolure, des membres et du thorax. Une conjonctivite ulcéralente ou, plus rarement, une pneumonie multifocale peuvent aussi être observées. La transmission de la maladie peut se réaliser par contact de matériel infecté avec une peau excoriée, par des piqûres de mouche ou de tiques, ou par inhalation. L'agent causal de la maladie, *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*, est un champignon dimorphique saprophyte vivant dans le sol. Le diagnostic différentiel de la maladie doit être fait avec la morve, due à *Burkholderia mallei*, la lymphangite ulcéralente due à *Corynebacterium pseudotuberculosis*, la sporothricose due à *Sporothrix schenckii*, et les formes cutanées d'infections à *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. L'injection d'amphotéricine B associée à un drainage local des blessures et des iodures inorganiques est utilisée pour le traitement des cas récents.*

Identification de l'agent pathogène : elle repose sur l'examen microscopique de l'agent pathogène, que l'on peut trouver dans des frottis d'exsudats ou sur coupes histologiques de lésions. Cet agent, qui ressemble à une levure, est présent en grand nombre dans les lésions avancées. Il se présente comme un organisme pléomorphe ovoïde ou globulaire de 2 à 5 µm de diamètre, extracellulaire et intracellulaire, situé dans les macrophages ou les cellules géantes. Le micro-organisme est généralement entouré d'un « halo » lorsqu'il est coloré par la méthode de Gram, par l'hématoxyline-éosine, par l'acide périodique de Schiff, ou par la méthode de Gomori à l'argent-méthénamine. La forme mycélienne de l'agent pathogène se développe lentement en aërobiose entre 25 et 30 °C sur de nombreux milieux de culture, dont la gélose mycobiotique, la gélose dextrosée enrichie de Sabouraud, l'infusion cœur-cerveille gélosée et les géloses nutritives pour PPLO (Pleuropneumonia-like Organisms). La réversion vers la forme levure à 37 °C doit être démontrée.

Épreuves sérologiques et autres tests : les anticorps dirigés contre *H. capsulatum* var. *farciminosum* sont élaborés avant ou dès qu'apparaissent les symptômes de la maladie. Les épreuves diagnostiques utilisées pour détecter ces anticorps comprennent l'immunofluorescence, le dosage immuno-enzymatique (ELISA) et l'épreuve d'hémagglutination passive. Un test cutané détectant l'état d'hypersensibilité retardée a été également décrit.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : des vaccins à base de microbes tués ou vivants ont été utilisés à petite échelle en zones enzootiques, mais ils sont difficiles à se procurer.

A. INTRODUCTION

La lymphangite épizootique est une maladie contagieuse et chronique des chevaux, des mules et des ânes. La maladie se caractérise par une dermatite pyogranulomateuse multifocale, suppurative, ulcéralente et envahissante ainsi que par une lymphangite. Ces lésions siègent habituellement aux extrémités des membres, au niveau de la paroi thoracique et au niveau de l'encolure, mais une conjonctivite palpébrale ulcéralente ou, rarement, une pneumonie multifocale peuvent aussi être observées. L'agent pathogène peut aussi envahir des lésions ouvertes telles que les abcès de gourme ou les blessures de castration. La maladie est également connue sous le nom de pseudo-farçin ou pseudo-morve. Une autre dénomination de cette affection, « histoplasmosse équine », serait sans doute meilleure, puisque tous les malades ne présentent pas de signes évidents de lymphangite. La forme

clinique que revêt la maladie semble surtout dépendre de la porte d'entrée de l'agent pathogène (17). Une blessure au niveau de la peau peut être infectée soit directement par du pus ou des sécrétions nasales ou oculaires infectés, soit indirectement à partir du sol ou des harnais contaminés, du matériel pour le toilettage, des récipients servant à l'alimentation ou à l'abreuvement, du matériel de pansage ou encore des mouches. En outre, les tiques sont soupçonnées de jouer un rôle dans la transmission de cette maladie (4). La forme conjonctivale semblerait se transmettre par piqûres de mouches des genres *Musca* ou *Stomoxys* (17). La forme pulmonaire est rare, et semblerait survenir après inhalation de l'agent pathogène. La période d'incubation varie de 3 semaines à 2 mois (3). Dans tous les cas, les lésions sont de type nodulaire et granulomateux, et l'agent causal une fois introduit dans l'organisme diffuse de proche en proche ou en suivant les canaux lymphatiques. Ces canaux lymphatiques s'épaississent souvent jusqu'à former des « cordes », et il se forme également des nodules pyogranulomateux. Les nœuds lymphatiques régionaux peuvent être épaissis et enflammés. En général, les lésions guérissent spontanément en 2 à 3 mois, donnant naissance à des cicatrices en forme d'étoile. Cependant, des lésions étendues avec des taux de mortalité élevée peuvent survenir dans les régions où l'alimentation est insuffisante et les soins vétérinaires de mauvaise qualité (3).

L'agent causal *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*, est un champignon dimorphique. La forme mycélienne est présente dans le sol alors que la forme levure est, en général, observée au niveau des lésions. *Histoplasma farciminosum* fut anciennement décrit comme une espèce indépendante, mais cette classification a depuis changé et elle est maintenant considérée comme étant une variété de *H. capsulatum* du fait des similarités morphologiques proches des formes à la fois mycélienne et levure (19). Au niveau antigénique, *H. capsulatum* var. *farciminosum* et *H. capsulatum* var. *capsulatum* sont indistinguables ; cependant, cette dernière, est enzootique en Amérique du Nord, a une gamme étendue d'hôtes et est responsable d'une histoplasmose disséminée (16). Les séquences ADN des 4 gènes codant es protéines ont été analysés afin d'élucider l'évolution des liens entre les différentes variétés de *H. capsulatum*. Il en ressort que *H. capsulatum* var. *farciminosum* est fortement rattachée à la branche de SAM Hcc group A, (H60 à -64, -67, -71, -74 et -76), ce qui laisse penser que cette variété est un isolat de la variété sud américaine de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (14).

La forme cutanée de la maladie peut être confondue avec la forme cutanée de la morve, due à *Burkholderia mallei*, la lymphangite ulcéreuse due à *Corynebacterium pseudotuberculosis*, les ulcères persistants dus à *Rhodococcus equi*, la sporotrichose due à *Sporothrix schenckii*, l'histoplasmose due à *H. capsulatum* var. *capsulatum*, la cryptococcose, la gourme et des lymphosarcomes sarcoïdes cutanés (13, 15).

La maladie est fréquente dans les régions tropicales ou sub-tropicales et elle est enzootique au en Afrique du Nord, du Nord-Est et de l'Est ainsi que dans certaines régions d'Asie notamment des pays autour de la Méditerranée, l'Inde, le Pakistan et le Japon. La maladie est très fréquente en Éthiopie, notamment chez les chevaux de calèches, touchant en moyenne 18,8 % des chevaux dans les régions chaudes et humides entre 1500 et 2300 mètres d'altitude (3, 4). Les rapports concernant d'autres régions du monde sont épisodiques, et doivent être confirmés par le laboratoire avant d'être avérés. La prévalence de la maladie augmente lors des rassemblements d'animaux. Elle était beaucoup plus répandue, jadis, lorsque de grands effectifs de chevaux se retrouvaient dans les mêmes écuries pour les besoins de l'armée ou des transports en commun. Ce sont les chevaux, les mules et les ânes qui paient le plus lourd tribut à la lymphangite épizootique, mais elle peut aussi toucher les camélidés, les bovins et les chiens (19). Les autres espèces sont réfractaires à l'inoculation expérimentale, à l'exception de certains animaux de laboratoire tels que les cobayes, les lapins et les souris (12, 17). Des cas d'infections humaines ont également été rapportés (2, 6, 11).

La maladie peut être éradiquée par l'abattage dans les normes des chevaux infectés, la désinfection des bâtiments infectés et la restriction des mouvements des chevaux à partir de bâtiments infectés. Dans les régions d'enzootie, dans lesquelles l'éradication est impossible, les iodures inorganiques peuvent être utilisés pour soigner les cas récents (1). Il est aussi possible d'ouvrir les nodules, de drainer le pus et de combler la cavité du nodule avec des pansements imprégnés de teinture d'iode à 7 %. L'Amphotéricine B peut être employée quand il y en a de disponible.

Les symptômes de la maladie pouvant être confondus avec ceux d'autres maladies, seules les analyses de laboratoire permettent de confirmer le diagnostic de terrain.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Les prélèvements à analyser doivent être effectués à partir de nodules intacts. Pour que le microbe puisse être isolé, le prélèvement doit être placé dans un milieu nutritif additionné d'antibiotiques et conservé au réfrigérateur jusqu'à son ensemencement, qui doit être réalisé le plus tôt possible. En vue d'un examen direct, des frottis peuvent être réalisés sur lame porte-objet à partir de fragments de lésions, et doivent être fixés aussitôt. En vue

de leur examen histologique, des coupes de lésions faites dans des tissus vivants ou morts seront placées dans du formol en solution à 10 % tamponnée et neutre. La présence de *H. capsulatum* var. *farciminosum* doit être démontrée pour confirmer le diagnostic de lymphangite.

a) Examen microscopique direct

- **Frottis colorés par la méthode de Gram**

Des frottis peuvent être colorés directement par la méthode de Gram, en vue de rechercher les agents pathogènes. Ces derniers ont la forme typique d'une levure, prenant le colorant de Gram, pléomorphiques, ovoïdes ou globuleux, d'un diamètre de 2 à 5 µm (2). Ils peuvent être isolés ou groupés, en position extracellulaire ou inclus dans des macrophages. Lors de l'examen à l'état frais, ils sont fréquemment entourés d'un halo.

- **Histopathologie**

L'aspect des lésions sur coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine est très caractéristique, consistant en une inflammation pyogranulomateuse fibroplasique où se retrouvent de nombreuses cellules géantes de Langhans. De nombreux agents pathogènes extracellulaires ou intracellulaires dans des macrophages ou des cellules géantes multinucléées sont observés dans les coupes anatomopathologiques colorées à l'hématoxyline-éosine, au réactif à l'acide périodique de Schiff ou par la méthode de Gomori à l'argent-méthénamine (16). Il semblerait que le nombre de germes augmente lorsque la maladie devient chronique. Ces germes sont pléomorphiques, souvent décrits comme des masses en forme de citron légèrement basophiles, d'un diamètre variant de 2 à 5 µm, et entourés d'un halo lors d'une coloration à l'hématoxyline-éosine ou par la méthode de Gram (1).

- **Microscopie électronique**

La microscopie électronique a été utilisée pour observer des biopsies de peau de 1,5 à 2 mm d'épaisseur préfixées immédiatement après leur prélèvement dans une solution à 2 % de glutaraldéhyde en tampon phosphate à 4 °C puis fixées définitivement dans du tétraoxyde d'osmium à 1 %. Sur des coupes ultrafines colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb, on peut observer les détails de la structure interne du champignon *H. capsulatum* var. *farciminosum*, y compris l'enveloppe cellulaire, la membrane plasmique, la paroi cellulaire et les structures internes de la cellule (1).

b) Culture

La forme mycélienne de *H. capsulatum* var. *farciminosum* pousse lentement (en 2 à 8 semaines à 26 °C). Parmi les milieux que l'on peut utiliser, on peut citer la gélose mycobiotique (2), la gélose dextrosée de Sabouraud à 2,5 % de glycérol, l'infusion cœur-cerveille gélosée à 10 % de sérum de cheval, et la gélose nutritive pour PPLO (« *pleuropneumonia-like organisms* ») à pH 7,8 additionnée de 2 % de dextrose et de 2,5 % de glycérol (11, 16). L'addition d'antibiotiques à tous ces milieux est recommandée : la cycloheximide (0,5 g/litre) et le chloramphénicol (0,5 g/litre). Pour obtenir une activité anti-bactérienne à large spectre, il convient d'utiliser la gentamycine (50 mg/litre) et la pénicilline G (6×10^6 unités/litre) à la place du chloramphénicol. Les colonies apparaissent en 2 à 8 semaines, formées d'un mycélium d'aspect chiffonné, sec, granuleux et de couleur blanc grisâtre, mais les colonies brunissent en vieillissant. Des formes aériennes peuvent se former, mais rarement. Les formes mycéliennes produisent une grande variété de conidies, comme des chlamydospores, des arthroconidies et quelques blastoconidies. En revanche, les grandes macroconidies rondes et à double paroi souvent observées avec *H. capsulatum* var. *capsulatum* sont absentes dans ce cas.

Le test peut être confirmé en induisant la formation de formes en levure de *H. capsulatum* var. *farciminosum* par subculture de morceaux de mycélium dans une infusion cœur-cerveille gélosée à 5 % de sérum de cheval ou dans du milieu de Pine, entre 35 et 37 °C en atmosphère à 5 % de CO₂. Les colonies en forme de levures sont plates, hérissées, d'aspect chiffonné, de couleur blanche à gris brun et de consistance pâteuse (16). Cependant, la réversion complète vers la forme levure peut ne pas être obtenue avant 4 ou 5 passages sur de nouveaux milieux tous les 8 Jours.

c) Inoculation à l'animal

L'inoculation expérimentale de *H. capsulatum* var. *farciminosum* a été tentée chez la souris, le cobaye et le lapin. Les souris dont l'immunité a été supprimée sont très sensibles à cette inoculation et peuvent être utilisées pour le diagnostic de la maladie (1).

2. Épreuves sérologiques

Il existe des publications décrivant les différentes épreuves qui permettent de rechercher les anticorps spécifiques de l'agent causal ainsi qu'un test d'hypersensibilité retardée qui permet de détecter la réaction d'immunité à médiation cellulaire. Les anticorps apparaissent habituellement au moment ou juste après l'apparition des symptômes.

a) Épreuves par immunofluorescence

- **Immunofluorescence indirecte**

L'épreuve qualitative suivante a été décrite par Fawi (7).

- Les micro-organismes servant à détecter les anticorps proviennent de l'étalement sur une lame porte-objet du contenu de lésions ou d'une fine émulsion en solution saline de germes en phase levure ;
- Les lames porte-objet sont fixées à la flamme ;
- Elles sont ensuite lavées dans une solution de tampon phosphate (PBS) pendant 1 min ;
- Les sérums à tester non dilués sont déposés sur la lame porte-objet et ensuite incubés 30 min à 37 °C ;
- Les lames sont ensuite lavées 3 fois pendant 10 min en PBS ;
- Un anticorps anti-cheval, conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et dilué de façon appropriée, est déposé ensuite sur la lame qui est incubée 30 min à 37 °C ;
- Les lames sont ensuite lavées 3 fois pendant 10 min en PBS ;
- Elles sont enfin observées au microscope à immunofluorescence.

- **Immunofluorescence directe**

L'épreuve suivante a été décrite par Gabal *et al.* (8).

- La fraction globulinique du sérum à tester est précipitée, puis remise en suspension jusqu'à atteindre le volume initial du sérum dans une solution saline. Le sérum est alors congugué à l'ITCF ;
- Des petits morceaux de colonies mycéliennes du germe sont mises en suspension dans 1 ou 2 gouttes de solution saline déposées sur une lame porte-objet. À l'aide d'une seconde lame porte-objet, les morceaux de colonies sont alors écrasés et étalés sur la lame de façon à former un film ;
- Les lames sont fixées par la chaleur ;
- Les lames sont lavées en PBS pendant 1 min ;
- Les lames sont incubées 60 min à 37 °C, en présence de différentes dilutions de sérum conjugué ;
- Les lames sont lavées 3 fois en PBS, chaque fois durant 5 min ;
- Les lames sont examinées au microscope à immunofluorescence ;

b) Épreuve immuno-enzymatique indirecte

L'épreuve suivante a été décrite par Gabal & Mohamed (10).

- L'agent pathogène sous forme mycélienne est obtenu sur gélose de Sabouraud dextrosée, en tubes incubés durant 4 semaines à 26 °C. Trois colonies sont prélevées et broyées dans 50 ml de PBS stérile. La suspension obtenue est diluée à 1/100, et cette dilution est utilisée pour sensibiliser les 96 puits des plaques de microtitrage, à raison de 100 µl par puits ;
- Les plaques sont incubées toute une nuit à 4 °C ;
- Les plaques sont lavées avec du PBS additionné de Tween 20 (0,5 ml/litre) (PBS-T), 3 fois 3 min chacune ;
- Les plaques, placées sur agitateur automatique, sont incubées avec de la sérum-albumine bovine à 5 %, à raison de 100 µl/puits, entre 23 et 25 °C durant 30 min ;
- Les plaques sont lavées avec du PBS-T, 3 fois 3 min chacune ;

- vi) Les sérums sont dilués de 2 en 2 dans du PBS-T en commençant à la dilution 1/50 et incubés entre 23 et 25 °C pendant 30 min ;
- vii) Les plaques sont lavées avec du PBS-T, 3 fois 3 min chacune ;
- viii) Des Ig G de chèvre anti-cheval marquées à la peroxydase sont diluées au 1/800 et placées à raison de 100 µl/puits, sur agitateur automatique, pour incubation durant 30 min entre 23 et 25 °C ;
- ix) Les plaques sont lavées avec du PBS-T, 3 fois 3 min chacune
- x) Finalement, du peroxyde d'hydrogène et de l'ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazoline]-6-sulphonic acid) en tampon citrique à pH 4 sont ajoutés, à raison de 100 µl/puits ;
- xi) Les plaques sont lues après 60 min dans un spectrophotomètre de 405 nm de longueur d'onde ;
- xii) Deux valeurs d'absorption sont relevées pour chacune des dilutions du sérum, et ce sont les écarts à la normale et les pourcentages moyens d'absorption qui sont pris en compte pour l'interprétation des résultats.

c) Test d'hémagglutination passive.

Le test suivant a été décrit par Gabal & Khalifa (9).

- i) L'agent pathogène est multiplié durant 8 semaines sur de la gélose de Sabouraud dextrosée. Cinq colonies sont alors raclées, broyées et mises en suspension dans 200 ml de solution saline puis soumises aux ultrasons durant 20 min. Les éléments mycéliens restants sont éliminés par filtration, et le filtrat lui-même est dilué au 1/160 ;
- ii) Des globules rouges normaux de mouton (GRM) sont lavées, traitées à l'acide tannique, relavées et mises en suspension à 1 % ;
- iii) Différentes dilutions de la préparation antigénique sont mélangées avec les GRM tannées et incubées 1 h au bain-marie à 37 °C. Les GRM sont récoltées par centrifugation, lavées 3 fois dans une solution saline tamponnée et remises en suspension à 1 % ;
- iv) Les sérums à tester sont inactivés par chauffage à 56 °C pendant 30 min puis absorbés sur un égal volume de GRM lavées ;
- v) Les dilutions de sérum (0,5 ml) sont placées dans des tubes à essai avec 0,05 ml de GRM tannées recouvertes d'antigène ;
- vi) L'agglutination est observée 2 et 12 h plus tard ;
- vii) La réaction est considérée comme positive lorsque les GRM forment un tapis uniforme au fond du tube. Le test est négatif lorsque les GRM sont assemblées en « bouton » au fond du tube.

d) Tests cutanés d'hypersensibilité retardée

Deux tests cutanés d'hypersensibilité retardée ont été décrits pour le diagnostic de la lymphangite épizootique. Le premier l'a été par Gabal et Khalifa puis a été adapté par Ameni *et al.* (5, 9).

- i) Une culture pure de *H. farcinimosum* est entretenue pendant 8 semaines sur gélose de Sabouraud dextrosée additionnée de 2,5 % de glycérol. Cinq colonies sont raclées et broyées dans 200 ml de solution saline, puis congelées et décongelées 5 fois et enfin soumises aux ultrasons (amplitude de 40°) pendant 20 min. Les éléments mycéliens restants sont éliminés par centrifugation à 1006 *g* à 4 °C pendant 11 min. La stérilité de la préparation est vérifiée par ensemencement d'un aliquote sur gélose de Sabouraud dextrosée, et incubation pendant 4 semaines à 26 °C ;
- ii) 0,1 ml de cette préparation contenant 0,2 mg/ml de protéine sont inoculés par voie intradermique au niveau de l'encolure des animaux ;
- iii) Le point d'inoculation est examiné et la réaction est considérée comme positive si une zone localement indurée et en relief apparaît 24 à 48 h après l'injection. Un accroissement de l'épaisseur de la peau supérieur à 4 mm est considéré comme positif.

Un second test possible, à « l'histofarcine », a été décrit par Soliman *et al.* (18).

- i) Une forme mycélienne du germe est obtenue par culture durant 4 mois entre 23 et 25 °C sur des disques de polystyrène flottant à la surface de 250 ml de milieu pour PPLO, additionné de 2 % de glucose et de 2,5 % de glycérine ;

- ii) Le filtrat de cette culture, débarrassé des formes mycéliennes, est mélangé à de l'acétone (2/1) et on laisse le tout reposer durant 48 h à 4 °C ;
- iii) Le surnageant est décanté et on laisse l'acétone s'évaporer ;
- iv) Le précipité est remis en suspension à 1/10 en eau distillée, jusqu'à reconstitution de son volume initial ;
- v) Les animaux reçoivent 0,1 ml de cet antigène par voie intradermique au niveau de l'encolure ;
- vi) Le point d'inoculation est examiné et la réaction est considérée comme positive si une zone localement indurée et en relief apparaît 24, 48 et 72 h après l'injection.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

La maladie est ordinairement maîtrisée par élimination des sources d'infection, obtenue par abattage de chevaux contaminés et application de strictes mesures d'hygiène. Des publications ont rapporté l'emploi de vaccins à germes tués (2) ou vivants atténués (20) en zone d'enzootie, avec d'assez bons succès semble-t-il.

Les antigènes utilisés pour les tests cutanés d'hypersensibilité ont été décrits au paragraphe précédent.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AL-ANI F.K. (1999). Epizootic lymphangitis in horses: a review of the literature. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **18**, 691–699.
2. AL-ANI F.K., ALI A.H. & BANNA H.B. (1998). *Histoplasma farciminosum* infection of horses in Iraq. *Veterinarski Arhiv.*, **68**, 101–107.
3. AMENI G. (2006). Preliminary trial on the reproducibility of epizootic lymphangitis through experimental infection of two horses. Short Communication. *Veterinary J.*, **172** (3), 553–555.
4. AMENI G. & TEREFE W. (2004). A cross-sectional study of epizootic lymphangitis in cart-mules in western Ethiopia. *Preventive Vet. Med.*, **66**, 93–99.
5. AMENI G. TEREFE W. & HAILU A. (2006). Histofarcin test for the diagnosis of epizootic lymphangitis in Ethiopia: development, optimisation and validation in the field. *Veterinary J.*, **171**, 358–362.
6. CHANDLER F.W., KAPLAN W. & AJELLO L. (1980). Histopathology of Mycotic Diseases. Year Book Medical Publishers, Chicago, USA, 70–72 and 216–217.
7. FAWI M.T. (1969). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Histoplasma farciminosum* infections in Equidae. *Br. Vet. J.*, **125**, 231–234.
8. GABAL M.A., BANA A.A. & GENDI M.E. (1983). The fluorescent antibody technique for diagnosis of equine histoplasmosis (epizootic lymphangitis). *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **30**, 283–287.
9. GABAL M.A. & KHALIFA K. (1983). Study on the immune response and serological diagnosis of equine histoplasmosis (epizootic lymphangitis). *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **30**, 317–321.
10. GABAL M.A. & MOHAMMED K.A. (1985). Use of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of equine *Histoplasma farciminosi* (epizootic lymphangitis). *Mycopathologia*, **91**, 35–37.
11. GUERIN C., ABEBE S. & TOUATI F. (1992). Epizootic lymphangitis in horses in Ethiopia. *J. Mycol. Med.*, **2**, 1–5.
12. HERVE V., LE GALL-CAMPODONICO P., BLANC F., IMPROVISI, L., DUPONT, B, MATHIOT C. & LE GALL F. (1994). Histoplasmosis a *Histoplasma farciminosum* chez un cheval africain. *J. Mycologie Med.*, **4**, 54.
13. JUNGERMAN P.F. & SCHWARTZMAN R.M. (1972). Veterinary Medical Mycology. Lea & Febiger. Philadelphia, USA.

14. KASUGA T., TAYLOR T.W. & WHITE T.J. (1999). Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* darling. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 653–663.
15. LEHMANN P.F. HOWARD D.H. & MILLER J.D. (1996). Veterinary Mycology. Springer-Verlag, Berlin, Germany, **96**, 251–263.
16. ROBINSON W.F. & MAXIE M.G. (1993). The cardiovascular system. *In: Pathology of Domestic Animals*, Vol. 3. Academic Press, New York, USA, 82–84.
17. SINGH T. (1965). Studies on epizootic lymphangitis. I. Modes of infection and transmission of equine histoplasmosis (epizootic lymphangitis). *Indian J. Vet. Sci.*, **35**, 102–110.
18. SOLIMAN R., SAAD M.A. & REFAI M. (1985). Studies on histoplasmosis farciminosii (epizootic lymphangitis) in Egypt. III. Application of a skin test ('histofarcin') in the diagnosis of epizootic lymphangitis in horses. *Mykosen*, **28**, 457–461.
19. UEDA Y., SANO A. TAMURA M., INOMATA T., KAMEI K., YOKOYAMA K., KISHI F., ITO J., Y., MIYAJI M. & NISHIMURA K. (2003). Diagnosis of histoplasmosis by detection of the internal transcribed spacer region of fungal rRNA gene from a paraffin-embedded skin sample from a dog in Japan. *Vet. Microbiol.*, **94**, 219–224.
20. ZHANG W.T., WANG Z.R., LIU Y.P., ZHANG D.L., LIANG P.Q., FANG Y.Z., HUANG Y.J. & GAO S.D. (1986). Attenuated vaccine against epizootic lymphangitis in horses. *Chinese J. Vet. Sci. Tech.*, **7**, 3–5.

*
* *

ENCÉPHALOMYÉLITES ÉQUINES (de l'Est et de l'Ouest)

RÉSUMÉ

Les virus des encéphalomyélites équines de l'Est et de l'Ouest appartiennent au genre Alphavirus de la famille des Togaviridae. Une alternance des infections entre les oiseaux et les moustiques maintient la circulation de ces virus dans la nature. La maladie se manifeste sporadiquement chez le cheval et l'humain du milieu de l'été jusqu'à la fin de l'automne. Le cheval et l'homme constituent des culs-de-sac épidémiologiques. La maladie chez le cheval est caractérisée par de la fièvre, de l'anorexie et un état de dépression sévère. Dans les cas graves, la maladie chez le cheval évolue vers une hyperexcitabilité, de la cécité, de l'ataxie, une dépression mentale sévère, un décubitus, des convulsions et la mort. L'infection par le virus de l'encéphalomyélite équine de l'est (EEE) est souvent létale chez le cheval alors que le virus de l'encéphalomyélite de l'ouest (WEE) provoque une maladie subclinique ou modérée avec un taux de mortalité inférieur à 30 %. Il a été écrit que les virus EEE et WEE pouvaient provoquer des maladies chez les volailles, les canards et les oiseaux de combat. Des cas sporadiques de EEE ont été signalés chez les bovins, les moutons, les porcs, les cerfs et les chiens.

Identification de l'agent pathogène : *une suspicion d'encéphalite équine de l'est et de l'ouest peut être posée quand les chevaux présentent des signes caractéristiques de somnolence et d'autres signes neurologiques évocateurs dans des régions où des insectes hématophages sont actifs. Il n'y a pas de lésions caractéristiques. Les lésions histopathologiques peuvent permettre une suspicion diagnostique. Le virus EEE peut parfois être isolé du cerveau et parfois d'autres tissus des chevaux morts. Le virus WEE est rarement isolé. Les virus EEE et WEE peuvent être isolés d'échantillons cliniques inoculés aux souris nouveau-nés, ou aux embryons de poulets, aux cellules en culture ou à des poussins nouvellement éclos. Le virus est identifié par la méthode de fixation du complément (FC), d'immunofluorescence ou de séroneutralisation par réduction des plages. Les ARN des virus EEE et WEE peuvent être détectés également par des techniques de transcription inverse couplée à l'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR).*

Épreuves sérologiques : *les anticorps peuvent être identifiés par les techniques de réduction de plages, d'inhibition de l'hémagglutination, de fixation du complément ou par une méthode immuno-enzymatique (ELISA) de capture d'IgM.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *les vaccins contre VEEE et VWEE sont sûrs et immunogènes. Ils sont produits sur des cellules en culture et sont inactivés avec le formol.*

A. INTRODUCTION

Les virus de l'encéphalomyélite équine de l'est (VEEE) et de l'encéphalomyélite équine de l'ouest (VWEE) sont des membres du genre *Alphavirus* de la famille des *Togaviridae*. Dans la nature, l'alternance des infections chez les oiseaux et les moustiques ornithophiles maintient la circulation du virus. La maladie clinique peut être observée chez les humains et les chevaux, ces deux espèces étant des culs-de-sac épidémiologiques pour ces virus. L'EEE a été diagnostiquée au Québec et dans l'Ontario au Canada, dans les régions centrales et orientales des États-Unis d'Amérique (USA), dans les îles Caraïbes, au Mexique et en Amérique Centrale et en Amérique du Sud. La maladie causée par le virus WEE a été rapportée dans l'ouest des USA et au Canada, au Mexique et en Amérique du Sud et en Amérique Centrale (13, 16, 24). Le virus « Highlands J » qui est très proche sur un plan antigénique du virus WEE, a été isolé dans l'est des USA. Bien que le virus « Highlands J » soit réputé ne pas

provoquer de maladie chez les mammifères, ce virus a été isolé du cerveau d'un cheval atteint d'encéphalite en Floride (7).

Même si la mortalité est plus faible pour WEE, les signes cliniques causés par les virus EEE et WEE sont identiques. La maladie causée par l'un ou l'autre des virus est aussi connue comme la « maladie du sommeil ». Après une durée d'incubation de 5 à 14 jours, les signes cliniques se manifestent par de la fièvre, de l'anorexie et de la dépression. Une suspicion d'infection à virus WEE ou EEE chez des chevaux non vaccinés peut-être posée si l'état de somnolence caractéristique se manifeste pendant l'été dans les régions à climat tempéré ou pendant la saison des pluies dans les régions à climat tropical ou subtropical, lorsque les populations d'insectes vecteurs sont actives. Cependant, d'autres maladies comme l'infection par le virus de la fièvre de West Nile et l'encéphalomyélite équine vénézuélienne (respectivement aux chapitres 2.1.20. et 2.5.14.) peuvent produire des signes cliniques similaires et le diagnostic doit être confirmé par un diagnostic de laboratoire. L'infection par le virus WEE chez les chevaux couvre souvent une large aire géographique, c'est-à-dire que des cas sporadiques sont observés dans une région de plus de 1 000 km². Les infections par le virus EEE sont le plus souvent observées dans des régions beaucoup moins étendues. Des foyers isolés avec des taux de mortalité élevés chez les oiseaux de combat en captivité, les faisans, les perdrix chukars, les pingouins des aquariums et les caillies ont été rapportés à des infections par les virus de l'EEE, de l'EEW ou du virus Highlands J (13, 16, 19). La plupart des encéphalomyélites chez les volailles domestiques sont causées par le virus EEE et ont lieu sur la côte Est des USA. Le virus est introduit par des moustiques, mais la transmission à l'intérieur d'un troupeau est essentiellement effectuée par picage des plumes et cannibalisme. Les deux virus WEE et EEE peuvent provoquer des maladies mortelles chez les ratites. Des entérites hémorragiques ont été observées chez des émeus infectés par les virus EEE et WEE et les taux de morbidité et mortalité peuvent être supérieurs à 85 %. Il a été montré que les virus Highlands J et EEE peuvent produire de la dépression, de la somnolence, réduire la production d'œufs et augmenter la mortalité chez les dindons (5). Il a été rapporté que le virus EEE pouvait provoquer une maladie chez les bovins (11, 14), les moutons (1), les porcs (3), les cerfs de Virginie (18) et les chiens (4).

Le virus EEE peut provoquer une maladie sévère chez l'homme avec un taux de mortalité de 30 à 70 % avec une fréquence élevée de séquelles irréversibles chez les patients qui survivent. L'infection par le virus WEE est le plus souvent modérée chez l'adulte mais peut être très sévère chez l'enfant. Le taux de létalité varie entre 3 et 14 %. Des infections sévères, voire mortelles dues aux virus WEE et EEE ont été rapportées chez les personnels de laboratoire ; de plus, toute manipulation de ces virus doit être réalisée dans un laboratoire de niveau de confinement 3 (cf. Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries »). Il est recommandé que les personnels soient vaccinés contre les infections à virus WEE et EEE (22). Des précautions doivent être aussi prises pour éviter les infections des manipulateurs lors d'autopsies de chevaux suspects d'avoir été infectés par ces virus de méningo-encéphalomyélite.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

La méthode de certitude pour le diagnostic d'infection pour les virus WEE ou EEE consiste en l'isolement de ces virus. Le virus EEE peut être isolé le plus souvent du cerveau des chevaux à la condition qu'il se soit écoulé moins de 5 jours entre l'apparition des signes cliniques et la mort du cheval. Le virus EEE peut fréquemment être isolé du cerveau même lorsque les titres en anticorps sériques sont élevés. Le virus WEE est rarement isolé des tissus de chevaux infectés. Le cerveau est le prélèvement de choix pour l'isolement du virus mais le virus a été isolé d'autres tissus comme le foie ou la rate. Il est recommandé que ces tissus soient prélevés en deux exemplaires, l'un pour l'isolement viral, l'autre prélevé dans du formol pour analyse histopathologique. Les échantillons pour isolement viral doivent être envoyés réfrigérés s'ils peuvent être reçus par le laboratoire dans un délai inférieur à 48 h après prélèvement, sinon ils doivent être congelés et envoyés avec de la carboglace. Un ensemble de différents tissus permettent de mettre en œuvre des méthodes de diagnostic d'autres maladies. Pour l'isolement, une suspension de tissus à 10 % est préparée dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,8, contenant de l'albumine sérique bovine (BSA) (fraction V : 0,75 %), de la pénicilline (100 unités/ml) et de la streptomycine (100 µg/ml). La suspension est clarifiée par centrifugation à 1 500 g pendant 30 min.

Les virus de l'EEE et de l'EEW peuvent être isolés sur un certain nombre de systèmes cellulaires. Les cultures de cellules les plus souvent utilisées sont les fibroblastes de première explantation d'embryon de poulet ou de canard, les lignées de cellules de rein de singe vert africain (Vero), de rein de lapin (RK-13) ou de rein de jeunes hamsters (BHK-21). L'isolement est en général réalisé en flacons de culture de 25 cm². Le tapis cellulaire confluent est inoculé avec 1 ml de la suspension de tissu. Après un délai de 1 à 2 h. pour assurer l'absorption du virus, le milieu de culture est ajouté. Les cultures sont incubées 6 à 8 jours et un passage aveugle est pratiqué, si nécessaire. Les virus de l'EEE et de l'EEW produisent un effet cytopathogène dans les tapis cellulaires. Les cultures infectées sont congelées. Après décongélation, les milieux récoltés sont utilisés pour l'identification.

Le souriceau nouveau-né est aussi un système sensible pour l'isolement du virus. L'inoculation intracrâniale à 1 à 2 portées de souriceaux nouveau-nés âgés de 4 jours avec 0,02 ml d'inoculum à l'aide d'une aiguille de 9,3 mm fixée à une seringue à tuberculine de 1 ml. Le site d'inoculation est situé latéralement à une ligne qui divise en deux l'un des hémisphères. Les souris sont observées pendant 10 jours. Les souris qui meurent dans les 24 h de l'inoculation sont éliminées. Deux à dix jours après l'inoculation, les souris mortes sont récupérées tous les jours et congelées à -70°C . Les cerveaux des souris sont retirés en vue de l'isolement viral par aspiration à l'aide d'une aiguille de 2,5 cm fixée à une seringue à tuberculine de 1 ml. Un second passage est réalisé uniquement si le virus n'a pu être identifié à partir des souris mortes après inoculation.

Les embryons de poulets sont réputés constituer un système moins sensible que les souriceaux nouveau-nés pour l'isolement primaire des virus EEE et WEE. Les suspensions de tissus peuvent être inoculées dans la cavité allantoïque à des embryons de poulets âgés de 6 à 8 jours. Aucun signe particulier ou lésionnel n'est observé chez les embryons infectés par ces virus. Les embryons inoculés sont incubés pendant 7 jours mais des mortalités surviennent le plus souvent 2 à 4 jours après inoculation. Le plus souvent un seul passage est effectué à moins qu'il n'y ait des embryons morts à partir desquels les virus n'ont pas pu être isolés. Des poussins nouvellement éclos se sont avérés sensibles à l'infection et sont utilisés pour l'isolement viral. Si cette méthode est utilisée, des précautions doivent être prises pour empêcher l'exposition des personnels de laboratoire aux aérosols car les oiseaux infectés peuvent excréter des virus hautement infectieux.

Les virus EEE et WEE peuvent être identifiés dans les cerveaux des souris infectées ou de poulets, le milieu de culture cellulaire ou le liquide amnio-allantoïque par la réaction de fixation du complément. Une suspension de tissu nerveux à 10 % est préparée dans du tampon Véronal (barbital) ; les liquides d'œufs ou le milieu de culture cellulaire sont utilisés purs ou dilués au 1/10 dans du tampon véronal. Le milieu ou la suspension sont centrifugés à 9 000 *g* pendant 30 min et le surnageant est analysé à l'aide d'un sérum hyperimmun ou de liquide d'ascite de souris préparé contre les virus EEE et WEE en suivant un protocole classique de FC (21). Le test de FC nécessite une incubation toute la nuit à 4°C du mélange sérum-antigène en présence de 7 unités de complément. Le virus peut être identifié en culture de cellules par immunofluorescence directe. La méthode la moins employée pour identifier le virus est la séroneutralisation virale comme indiquée ci-dessus.

Des réactions de transcription inverse suivie par une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) ont été décrites pour détecter l'acide nucléique viral chez les vertébrés et les moustiques, bien que peu d'entre elles aient été validées sur des échantillons de mammifères (8, 9, 12, 23). Une épreuve de PCR multiplex a été mise au point pour assurer un diagnostic différentiel chez les chevaux suspectés d'être atteints par l'EEE ou l'encéphalomyélite à virus West Nile (6). Comparée à l'isolement sur culture cellulaire, cette épreuve a fait preuve d'une plus grande rapidité et d'une meilleure sensibilité, et elle a été utilisée efficacement aux États-Unis d'Amérique au cours des épisodes récents à arbovirus. Récemment, une RT-PCR associée à une épreuve immuno-enzymatique a été décrite comme capable d'identifier les alpha-virus pathogènes pour les humains (25).

Une technique immuno-enzymatique (ELISA) de capture d'antigène a été développée pour la surveillance du virus EEE chez les moustiques. Elle peut être utilisée dans les pays qui n'ont pas les possibilités de réaliser l'isolement du virus ou la PCR (2). Des procédures immunohistochimiques pour le diagnostic de l'EEE ont aussi été décrites (15).

2. Épreuves sérologiques

La confirmation sérologique des infections par les virus EEE ou WEE repose sur la détection d'une augmentation ou d'une réduction des titres en anticorps d'un facteur 4 au moins dans des sérums prélevés avec un intervalle de 10 à 14 jours. La plupart des chevaux infectés avec le virus EEE ou le virus WEE possèdent le plus souvent des anticorps dans la phase aiguë de la maladie. En conséquence, un diagnostic de suspicion peut être posé quand les chevaux non vaccinés avec des signes cliniques évocateurs ont des anticorps anti-virus EEE et WEE uniquement. La détection d'anticorps IgM par ELISA permet aussi un diagnostic d'infection aiguë (17). La séroneutralisation par réduction des plages ou ce qui est préférable une combinaison de cette méthode et de celle d'inhibition de l'héماغglutination (IHA) est la procédure la plus souvent utilisée pour la détection d'anticorps contre les virus EEE et WEE. Il peut y avoir des réactions croisées entre ces virus lorsque l'on utilise les techniques de la fixation du complément (FC) et d'IHA. Les anticorps de FC contre les deux virus EEE et WEE apparaissent plus tard et ne persistent pas ; par conséquent, ils sont moins utilisés pour le diagnostic sérologique de la maladie.

a) Fixation du complément

Le test de FC est fréquemment utilisé pour mettre en évidence les anticorps bien que ceux-ci ne persistent pas aussi longtemps que ceux détectés par IHA et par l'épreuve de réduction des plages. Un extrait de cerveaux de souris en sucrose/acétone est classiquement utilisé comme antigène. L'antigène positif est inactivé par traitement avec 0,1 % de bêta-propiolactone.

En l'absence de sérum de référence international, l'antigène doit être titré avec un sérum témoin positif préparé localement. L'antigène normal ou antigène « témoin » est composé de cerveaux de souris non inoculées et extraits et dilués de façon identique à l'antigène positif.

Les sérums sont dilués au 1/4 dans du tampon salin véronal contenant de la gélatine (VBSG) à 1 % et inactivés à 56 °C pendant 30 min. Les titrages des sérums positifs peuvent être réalisés en utilisant des dilutions de 2 en 2. Les antigènes FC et l'antigène témoin (cerveau de souris non infectée) sont dilués dans du VBSG jusqu'à la concentration optimale pour la fixation par détermination de leur titre avec un sérum positif ; le complément de cobaye est dilué dans du VBSG pour contenir 5 unités hémolytiques de complément à 50 % (CH_{50}). Les sérums, antigènes et complément sont mis en contact dans des microplaques de 96 puits à fonds ronds à 4 °C pendant 18 h. Les globules rouges de mouton sont normalisés à une concentration de 2,8 %. L'hémolysine est titrée pour déterminer la dilution optimale du lot du complément utilisé. L'hémolysine est utilisée pour sensibiliser les globules rouges à 2,8 % et les cellules sensibilisées sont ajoutées à tous les puits de la microplaque. Les plaques sont incubées à 37 °C pendant 30 min. Les plaques sont alors centrifugées (200 g) et le degré d'hémolyse des puits est noté. Les témoins suivants sont utilisés : (a) sérum à tester et les sérums témoins avec pour chacun, 5 CH_{50} et 2,5 CH_{50} de complément ; (b) l'antigène de FC et l'antigène témoin avec pour chacun 5 CH_{50} et 2,5 CH_{50} de complément ; (c) les dilutions de complément de 5 CH_{50} et 2,5 CH_{50} et 1,25 CH_{50} et (d) les puits témoins des cellules ne contenant que les globules rouges de mouton et le tampon VBSG. Ces différents puits permettent de contrôler les propriétés anti-complémentaires de l'antigène, du sérum, l'activité du complément utilisé et la qualité du système hémolytique globules rouges de mouton en l'absence de complément respectivement.

Afin d'éviter les effets anti-complémentaires, les sérums doivent être séparés du sang le plus vite possible. Des sérums témoins positifs et négatifs doivent être utilisés dans ce test.

b) Inhibition de l'hémagglutination

L'antigène pour l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) est le même que celui décrit au-dessus pour le test FC. L'antigène est dilué afin que la quantité qui sera utilisée pour chaque unité hémagglutinante (UHA) soit 4 à 8 fois supérieure à celle qui agglutine 50 % des globules rouges dans l'épreuve. Le titre hémagglutinant et le pH optimal pour chaque antigène sont déterminés avec des globules rouges d'oies dilués dans des solutions dont les pH varient de 5,8 à 6,6 avec une raison de 0,2.

Les sérums sont dilués au 1/10 dans du sel de borate pH 9,0 et sont ensuite inactivés à 56 °C pendant 30 min. Les inhibiteurs non-spécifiques peuvent aussi être éliminés par un traitement du sérum dilué au 1/10 dans du PBS à l'acétone suivi par une reconstitution dans un tampon physiologique boraté. Le traitement au kaolin est utilisé pour enlever les inhibiteurs sériques non spécifiques. Les sérums doivent être adsorbés avant utilisation par incubation avec 0,05 ml de globules rouges d'oies pendant 20 min à 4 °C.

Après inactivation par la chaleur, le traitement au kaolin et adsorption, des dilutions de 2 en 2 des sérums traités sont préparés dans du sel de borate, pH 9,0 avec 0,4 % d'albumine bovine. Les dilutions de sérums (0,025 ml/puits) sont préparées dans une microplaque de 96 puits à fonds ronds dans des dilutions de 2 en 2 en sel de borate, pH 9,0, avec 0,4 % d'albumine bovine. L'antigène (0,025 ml/puits) est ajouté au sérum. Les plaques sont incubées toute la nuit à 4 °C. Les globules rouges sont obtenus à partir d'oies mâles blanches¹ et lavés 3 fois dans du tampon véronal dextrose/gélatine (DGV) et une suspension à 7 % est préparée dans du DGV. La suspension à 7 % est ensuite diluée au 1/24 dans la solution avec un pH approprié et 0,05 ml par puits sont ajoutés immédiatement aux plaques. Les plaques sont incubées pendant 30 min à 37 °C. Les sérums témoins donnent les résultats attendus. Les titres au 1/10 et 1/20 sont considérés comme douteux et les titres supérieurs ou égal au 1/40 sont positifs.

c) Méthode immuno-enzymatique

L'ELISA est réalisé en fixant des anticorps anti-IgM équins dans des plaques à cupules à fonds plats (17). L'anticorps est dilué selon les recommandations du fabricant dans un tampon 0,5 M carbonate, pH 9,6 et 50 µl sont ajoutés à chaque puits. Les plaques sont incubées à 37 °C pendant 1 h puis toute la nuit à 4 °C. Avant utilisation les plaques sensibilisées sont lavées 2 fois avec 200 à 300 µl par puits de PBS 0,01 M contenant 0,05 % de Tween 20. Après le second lavage, 200 µl par puits de tampon PBS/Tween 15 %/lait écrémé sont ajoutés et les plaques sont incubées à température ambiante pendant 1 h. Après incubation, les plaques sont encore lavées 3 fois avec du PBS/Tween. Les sérums à tester et les témoins sont dilués au 1/400 dans du tampon 0,01 M PBS, pH 7,2 contenant 0,05 % Tween 20 et 50 µl sont ajoutés à chaque puits. Les plaques sont incubées à 39 °C pendant 90 min et ensuite lavées 3 fois. Ensuite, 50 µl d'antigène viral sont ajoutés à tous les puits (la dilution de l'antigène dépend de son origine et doit être

1 Les globules d'oies domestiques mâles et blanches sont préférables, mais les hématies d'autres oies mâles peuvent être utilisées. Si des cellules de femelles d'oie sont utilisées, la variabilité de l'épreuve peut être plus importante. Il a été décrit que les hématies de coq causent une diminution de la sensibilité de l'épreuve.

déterminé empiriquement). Les plaques sont incubées toute la nuit à 4 °C et lavées 3 fois. Ensuite, sont ajoutés 50 µl d'un anticorps monoclonal (AcM) conjugué à la peroxydase du raifort dirigé contre un virus d'encéphalite². Les plaques sont incubées pendant 90 min à 37 °C et ensuite lavées 6 fois. Enfin, 50 µl du substrat ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-éthylbenzo-thiazoline-6-acide sulfonique]) et du peroxyde d'hydrogène sont ajoutés et les plaques sont incubées à température ambiante 15 à 40 min. L'absorbance des sérums à tester est mesurée à 405 nm. Un sérum est considéré comme positif si la valeur d'absorbance du sérum dans les puits contenant l'antigène est au moins 2 fois supérieure à l'absorbance du sérum témoin négatif dans les puits contenant l'antigène viral et au moins 2 fois l'absorbance de l'échantillon testé en parallèle dans les puits contenant l'antigène normal.

d) Séroneutralisation par réduction des plages

La séroneutralisation par réduction de plages est très spécifique et peut être utilisée pour différencier les infections à virus EEE et WEE. L'épreuve est réalisée sur fibroblastes d'embryons de canard, cellules Vero ou BHK-21 en culture dans des flacons de 25 cm² ou des plaques à 6 cupules. Les sérums sont testés à des dilutions finales au 1/10 et 1/100. Les points « limites » sont établis en utilisant l'épreuve de réduction de plages ou d'IHA. Les sérums à tester dans l'épreuve de réduction de plages le sont contre 100 unités de virus formant plages (UFP) (50 UFP pour des plaques à 6 cupules). Le mélange virus/sérums est incubé à 37 °C pendant 75 min avant inoculation à des tapis de cellules confluentes dans des flacons de 25 cm². L'inoculum est adsorbé pendant 1 h puis 6 ml de milieu de surcouche sont ajoutés. Le milieu de surcouche consiste en deux solutions qui sont préparées séparément. La solution I contient de la solution saline basique d'Earle sans rouge de phénol (×2), 4 % de sérum de fœtus bovin, 100 µg de gentamycine, 200 µg/ml de nystatine, 0,45 % d'une solution de bicarbonate de sodium de sodium et 0,002 % d'une solution de rouge neutre. Quand des fibroblastes d'embryon de canard sont utilisés, la solution I contient aussi 6,6 % d'hydrolysate de lactalbumine d'extrait de levure. La solution II consiste en de l'agarose noble à 2 % qui est stérilisée et maintenue à 47 °C. Des volumes identiques des solutions I et II sont ajustés à 47 °C et sont mélangés ensemble juste avant utilisation. Les flacons sont incubés pendant 48 à 72 h et les points « limites » correspondent à 90 % de réduction du nombre de plages comparé avec les boîtes du contrôle de virus qui doivent présenter 100 plages.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Les vaccins inactivés contre les virus EEE et WEE sont disponibles commercialement. Les vaccins atténués contre les virus EEE et WEE se sont avérés décevants. Les vaccins enregistrés aux USA sont préparés en utilisant les combinaisons suivantes : virus EEE et WEE ; EEE, WEE et le virus de l'encéphalomyélite équine vénézuélienne (VEE) et EEE et VEE. En plus, l'anatoxine tétanique, le virus inactivé de la grippe équine et le virus inactivé de West Nile sont associés aux virus EEE et WEE ou EEE, WEE et VEE. Les premiers vaccins étaient produits sur œufs de poulets embryonnés et inactivés au formol. Les vaccins actuels sont préparés à partir de virus produit sur culture cellulaire et inactivé au formol (10) ou par la monoéthylamine.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Les souches de référence des virus EEE et WEE qui ont été isolées il y a 20 ans ont été utilisées pour la production de vaccin et il a été démontré qu'elles induisaient une immunité protectrice. Des souches de virus EEE qui diffèrent sur un plan antigénique et dans leurs caractéristiques moléculaires ont été identifiées dans différentes régions géographiques. Cependant, les isolats nord-américains et des Caraïbes semblent similaires (26). Les souches de virus WEE isolées à partir de différents pays s'avèrent être identiques à la fois dans leur réactivité vis-à-vis d'AcM et par analyse de leur ARN par polymorphisme de restriction (16). L'obtention d'un isolat récent et bien caractérisé dans un pays où le vaccin doit être utilisé constitue un élément utile. Les virus qui sont sélectionnés doivent être immunogènes et donner des titres élevés en cultures cellulaires.

b) Méthode de culture

Des cultures de première explantation de fibroblastes d'embryons de poulets et de cellules Vero sont utilisées pour la multiplication du virus utilisé pour la production du vaccin. Les fibroblastes doivent être préparés à partir d'embryons indemnes d'organismes pathogènes spécifiques. D'autres lignées de cellules susceptibles peuvent être utilisées.

2 Disponible à : Centers for disease Control and prevention, Bio reference reagents 1600 Clifton Road NE, Mail stop C21 Atlanta Georgia 30 333, États-Unis d'Amérique.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Si une lignée cellulaire est utilisée, le stock de cellules initiales est analysé pour confirmer l'identité des cellules en lignée, les espèces d'origines et l'absence d'agents contaminants. Si des cultures de cellules de première explantation sont utilisées, un tapis de chaque lot de chaque sous-culture doit être analysé pour ce qui est de l'absence de contaminants notamment les bactéries, champignons, mycoplasmes et virus. Le lot de semence primaire doit aussi être analysé pour garantir l'absence de bactéries, champignons, mycoplasmes et virus contaminants (voir Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques », pour la description de la méthode à suivre).

Les vaccins sont administrés par voie intramusculaire (dans la plupart des cas) ou par voie intradermique dans la région cervicale en deux injections données effectuées à 2-4 semaines d'intervalle. Un rappel annuel est recommandé. Tous les poulains vaccinés avant l'âge d'1 an doivent être vaccinés à nouveau avant la prochaine saison d'activité des insectes vecteurs.

2. Méthode de fabrication

Les informations sur la production des vaccins présents actuellement sur le marché ne sont pas disponibles. Par conséquent, l'information fournie ici doit être considérée comme une description générale sur les vaccins et comme une méthode de fabrication. Le virus et le système de cellules en culture doivent être choisis de façon à ce qu'un titre élevé, $\geq 10^6$ DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire), soit obtenu en 48 h environ. Les virus employés pour la production des vaccins peuvent être préparés à partir de liquide de surnageant des cultures de cellules infectées. Le liquide est retiré lorsque 70 à 100 % du tapis présente des effets cytopathogènes. Le titre du virus est déterminé par titrage en culture de cellules ou sur souris. Le liquide est clarifié par centrifugation lente et filtré. Le virus est inactivé par addition de formol à concentration finale de 1/2 000 (0,05 %) et placé à 37 °C pendant 24 h. Les résidus de formol sont neutralisés par du bisulfite de sodium (10). Les résidus de formol présents dans le vaccin ne doivent pas excéder 0,02 % de la quantité de formol initiale.

3. Contrôles en cours de fabrication

Les cultures doivent être examinées tous les jours pour repérer l'apparition d'effets cytopathogènes. Le virus récupéré doit être analysé afin de vérifier l'absence de contamination microbienne. L'efficacité du procédé d'inactivation doit être vérifiée sur du virus infectieux.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et de contrôle d'absence de contaminations du matériel biologique sont décrits dans le Chapitre 1.1.9.

b) Innocuité

L'innocuité du vaccin inactivé est testée par inoculation par voie sous cutanée à des poulets âgés de 6 à 12 h au moins, de 0,5 ml de vaccin. Les poulets sont observés chaque jour pendant 10 jours afin de repérer des effets indésirables dus au vaccin (20). Les tests d'innocuité peuvent aussi être réalisés par inoculation intra cérébrale à des souris âgées d'au moins 1 à 4 jours avec 0,02 ml de vaccin et sont observées pendant 7 jours. Il est important que les tests d'innocuité soient conduits sur chaque lot de vaccin pour confirmer qu'il n'y a pas de virus résiduel.

c) Activité

Les tests d'activité sont réalisés en inoculant 10 cobayes chacun avec l'un des deux virus EEE ou WEE, avec la moitié de la dose administrée au cheval et ceci en deux occasions à 14-21 jours d'intervalle par voie recommandée chez le cheval. Les échantillons de sérum des animaux vaccinés ou témoins sont analysés 14 à 21 jours après la seconde injection en utilisant l'épreuve de réduction de plaques. Les titres sérologiques vis-à-vis du virus EEE doivent être $\geq 1/40$ (20) ainsi que ceux de WEE, en cellules Vero. Si les fibroblastes d'embryons de poulets sont utilisés dans l'épreuve de réduction de plaques, les titres seront faibles. Un test d'activité alternatif est l'épreuve par voie intra-cérébrale, 14 à 21 jours après la seconde vaccination. Chaque cobaye est inoculé avec 0,1 ml de virus contenant 100 DL₅₀ (dose létale 50 %). Simultanément, le titrage est réalisé. Pour que le vaccin soit conforme, 80 % des cobayes doivent survivre aux épreuves effectuées avec les deux virus.

d) Durée de l'immunité

Aucune étude validée sur la durée de l'immunité n'est disponible. Un rappel annuel est recommandé. Les poulains qui sont vaccinés avant l'âge d'1 an doivent être revaccinés avant la prochaine saison d'activité des vecteurs.

e) Stabilité

Le vaccin lyophilisé est stable et immunogène pendant 3 ans s'il est conservé au réfrigérateur à 2-7 °C. Après 3 ans, le vaccin ne doit plus être utilisé. Les vaccins doivent être utilisés immédiatement après reconstitution.

f) Agents de conservation

Les agents de conservation sont le thimérosal à la dilution 1/10 000 et les antibiotiques (néomycine, polymyxine, amphotéricine B et gentamycine).

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Des infections sévères voire mortelles causées par les virus EEE et WEE ont été décrites chez le personnel de laboratoire ; par conséquent toute manipulation de ces virus doit être effectuée dans un laboratoire de niveau de confinement au moins égal à 3 (voir Chapitre 1.1.2.) et dans des postes de sécurité microbiologique et, il est recommandé de vacciner le personnel contre les virus EEE et WEE (22).

Les juments gestantes et les poulains âgés de moins de 2 semaines ne doivent pas être vaccinées.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir section C.4.b.

b) Activité

Voir section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BAUER R.W., GILL M.S., POSTON R.B. & KIM D. Y. (2005). Naturally occurring eastern equine encephalitis in a Hampshire wether. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 281–285.
2. BROWN T.M., MITCHELL C.J., NASCI R.S., SMITH G.C. & ROEHRIG J.T. (2001). Detection of eastern equine encephalitis virus in infected mosquitoes using a monoclonal antibody-based antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **65**, 208–213.
3. ELVINGER F., BALDWIN C.A., LIGGETT A.D., TANK K.N., & STALLKNECHT D.E. (1996). Prevalence of exposure to eastern equine encephalomyelitis virus in domestic and feral swine in Georgia. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 481–484.
4. FARRAR M.D., MILLER D. L., BALDWIN C. A., STIVER S. L. & HALL C. L. (2005). Eastern equine encephalitis in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 614–617.
5. GUY J.S. (1997). Arbovirus Infections. In: Diseases of Poultry, Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R., & Saif Y.M., ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 765–772.
6. JOHNSON D.J., OSTLUND E.N. & SCHMITT B.J. (2003). Nested multiplex RT-PCR for detection and differentiation of West Nile virus and eastern equine encephalomyelitis virus in brain tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 488–493.
7. KARABATSOS N., LEWIS A.L., CALISHER C.H., HUNT A.R. & ROEHRIG J.T. (1988). Identification of Highland J virus from a Florida horse. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **39**, 603–606.
8. LAMBERT A.J., MARTIN D.A. & LANCIOTTI R.S. (2003). Detection of North American eastern and western equine encephalitis viruses by nucleic acid amplification assays. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 379–385.

9. LINSSEN B., KINNEY R.M., AGUILAR P., RUSSELL K.L., WATTS D.M., KAADEN O.R. & PFEFFER M. (2000). Development of reverse transcription-PCR assays specific for detection of equine encephalitis viruses. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 527–535.
10. MAIRE L.F. III, MCKINNEY R.W. & COLE F.E. Jr (1970). An inactivated eastern equine encephalomyelitis vaccine propagated in chick-embryo cell culture. I. Production and testing. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **19**, 119–122.
11. MCGEE E.D., LITTLETON C.H., MAPP J.B. & BROWN R.J. (1992). Eastern equine encephalomyelitis in an adult cow. *Vet. Pathol.*, **29**, 361–363.
12. MONROY A.M., SCOTT T.W. & WEBB B.A. (1996). Evaluation of reverse transcriptase polymerase chain reaction for the detection of eastern equine encephalomyelitis virus during vector surveillance. *J. Med. Entomol.*, **33**, 449–457.
13. MORRIS C.D. (1989). Eastern equine encephalomyelitis. In: *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. 3, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1–12.
14. PURSELL A.R., MITCHELL F.E. & SEIBOLD H.R. (1976). Naturally occurring and experimentally induced eastern encephalomyelitis in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **169**, 1101–1103.
15. PATTERSON J.S., MAES R.K., MULLANEY T.P., & BENSON C.L. (1996). Immunohistochemical Diagnosis of Eastern Equine Encephalomyelitis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 156–160.
16. REISEN W.K. & MONATH T.P. (1989). Western equine encephalomyelitis. In: *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. 5, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 89–137.
17. SAHU S.P., ALSTAD A.D., PEDERSEN D.D. & PEARSON J.E. (1994). Diagnosis of eastern equine encephalomyelitis virus infection in horses by immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 34–38.
18. TATE C.M., HOWERTH E.W., STALLKNECHT D.E., ALLISTON, A.B., FISHER J.R. & MEAD D.G. (2005). Eastern equine encephalitis in a free-ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Wildl. Dis.*, **41**, 241–245.
19. TUTTLE A.D., ANDREADIS T.G., FRASCA S. JR & DUNN J.L. (2005). Eastern equine encephalitis in a flock of African penguins maintained at an aquarium. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **226**, 2059–2062.
20. UNITED STATES CODE OF FEDERAL REGULATIONS (2000). Encephalomyelitis vaccine: Eastern and Western killed virus. Title 9, Part 113, Section 113.207. US Government Printing Office, Washington DC, USA, 601–602.
21. UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE (1974). A Guide to the Performance of the Standardised Complement Fixation Method and Adaptation to Micro Test. Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA.
22. UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (1999). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. US Government Printing Office, Washington DC, USA, 183–184.
23. VODKIN M.H., MCLAUGHLIN G.L., DAY J.F., SHOPE R.E. & NOVAK R.J. (1993). A rapid diagnostic assay for eastern equine encephalomyelitis viral-RNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**, 772–776.
24. WALTON T.E. (1981). Venezuelan, eastern, and western encephalomyelitis. In: *Virus Diseases of Food Animals. A World Geography of Epidemiology and Control. Disease Monographs*, Vol. 2, Gibbs E.P.J., ed. Academic Press, New York, USA, 587–625.
25. WANG E., PAESSLER S., AGUILAR P.V., CARRARA A.S., NI H., GREENE I.P. & WEAVER S.C. (2006). Reverse transcription-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection and differentiation of alphavirus infections. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 4000–4008.

26. WEAVER S.C., HAGENBAUGH A., BELLEW L.A., GOUSSET L., MALLAMPALLI V., HOLLAND J.J. & SCOTT T.W. (1994). Evolution of Alphaviruses in the eastern equine encephalomyelitis complex. *J. Virol.*, **68**, 158–169.

*

* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour les encéphalomyélites équines (De l'Est et de l'Ouest) (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).

ANÉMIE INFECTIEUSE DES ÉQUIDÉS

RÉSUMÉ

L'anémie infectieuse des Équidés (AIE) est une infection virale persistante des équidés. L'agent causal, le virus de l'AIE, est un lentivirus de la famille des Retroviridae, sous-famille des Orthoretrovirinae. Les autres membres du genre lentivirus sont entre autres : le virus de l'immunodéficience bovine, le virus de l'arthrite-encéphalite caprine, le virus de l'immunodéficience féline, les virus 1 et 2 de l'immunodéficience humaine et le virus du maedi-visna. L'AIE peut être diagnostiquée sur la base des signes cliniques, des lésions, de la sérologie et de techniques moléculaires. Les chevaux infectés demeurent porteurs du virus pendant toute leur vie et, à de rares exceptions près, fournissent une réponse sérologique positive. Habituellement, les anticorps demeurent présents et les animaux à réponse positive, de plus de 6 à 8 mois, sont des porteurs du virus (chez les animaux âgés de moins de 6 à 8 mois, une réponse sérologique positive peut être due à des anticorps d'origine maternelle et le statut de ces animaux peut être confirmé par les techniques moléculaires). Les chevaux infectés sont des réservoirs potentiels de virus. Dans les conditions naturelles, les mouches hématophages sont les vecteurs mécaniques de ce virus.

Identification de l'agent pathogène : à partir d'un cheval, le virus peut être isolé par inoculation de sang suspect à un cheval indemne ou à une culture de leucocytes préparée à partir d'un cheval indemne. La reconnaissance de l'infection chez des chevaux ayant reçu une inoculation expérimentale peut être faite sur la base des signes cliniques, des modifications hématologiques et d'une réponse sérologique positive à l'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) ou au dosage immuno-enzymatique (ELISA) ou par des techniques moléculaires. L'isolement du virus en culture de leucocytes de cheval peut être confirmée par la mise en évidence d'antigène spécifique de l'AIE par immunofluorescence, par réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), par essai de transcriptase inverse ou par inoculation du liquide de culture à des chevaux indemnes. La mise en évidence du virus est rarement faite à cause du temps nécessaire, des difficultés et du coût.

Épreuves sérologiques : les épreuves d'IDG et ELISA sont simples et fiables pour l'identification de l'infection par le virus de l'AIE. Une réponse sérologique positive en ELISA doit être confirmée par l'épreuve d'IDG. Les antigènes du virus de l'AIE peuvent être préparés à partir de cultures tissulaires infectées ou en utilisant de l'ADN recombinant.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : aucun produit biologique n'est actuellement disponible.

A. INTRODUCTION

L'anémie infectieuse des Équidés (AIE) sévit dans le monde entier. L'infection, anciennement connu sous le nom de fièvre des marais, est limitée aux équidés. La maladie est caractérisée par des crises fébriles récurrentes, une thrombocytopénie, de l'anémie, une perte rapide de poids et un œdème des parties déclives ; si la mort ne résulte pas d'une crise, une infection chronique se développe et la maladie a tendance à devenir inapparente. La période d'incubation est normalement de 1 à 3 semaines, mais peut atteindre 3 mois. Dans les cas aigus, les nœuds lymphatiques, la rate et le foie sont congestionnés et hypertrophiés. L'hypertrophie de la rate peut être perçue par exploration rectale. À l'examen microscopique, ces organes sont infiltrés par des groupes de lymphocytes immatures et de plasmocytes. Dans le foie, les cellules de Kupffer contiennent des hématies ou de l'hémossidérine. La maladie doit être différenciée de l'artérite virale des Équidés (voir Chapitre 2.5.10.), et des autres causes d'œdème, de fièvre ou d'anémie.

Le sang d'un cheval infecté par le virus de l'AIE demeure infectieux pendant toute sa vie. Ceci signifie que le cheval est porteur virémique et peut en principe transmettre l'infection à d'autres chevaux (4). La transmission se fait par transfert de sang à partir d'un cheval infecté. Dans les conditions naturelles, elle se fait, le plus souvent, à l'occasion de repas sanguin interrompu de Tabanidés sur un cheval cliniquement atteint, poursuivi sur un cheval indemne. La transmission peut aussi être d'origine iatrogène par l'intermédiaire d'aiguilles souillées. L'infection du fœtus *in utero* peut également survenir (9). Le titre de la virémie est beaucoup plus élevé chez les chevaux cliniquement atteints et, par suite, le risque de transmission est beaucoup plus important à partir de ces animaux qu'à partir des porteurs de virus en état d'infection latente dont le titre virémique est plus faible.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Les épreuves d'immunodiffusion en gélose (IDG) (7) et immuno-enzymatiques (ELISA) (17) sont fiables pour l'identification de l'AIE chez les chevaux, sauf au début de l'infection d'un animal et chez les poulains nés de mère infectée. Dans de rares autres circonstances, une réponse faussement négative peut survenir, par exemple lorsque le titre de la virémie au cours d'une crise est suffisant pour se combiner aux anticorps circulants ou lorsque le titre des anticorps demeure insuffisant pour être détecté pendant une longue période (18). L'ELISA permet de détecter des titres en anticorps plus faibles que l'IDG et fournit un résultat positif plus précocement, mais tout résultat positif en ELISA doit être confirmé par IDG, à cause de résultats faussement positifs qui sont parfois rencontrés avec l'ELISA. L'IDG a également l'avantage de permettre la distinction entre les lignes de précipité spécifique d'AIE et celles d'autres antigènes. Le virus de l'AIE est un lentivirus, de la famille des *Retroviridae*, sous-famille des *Orthoretrovirinae* qui comprend également les virus, de l'arthrite encéphalite caprine, de l'immunodéficience bovine, de l'immunodéficience féline, de l'immunodéficience humaine (virus 1 et 2) et de visna-maedi. La comparaison des séquences des acides nucléiques a montré l'existence d'une grande analogie entre ces virus.

1. Identification de l'agent pathogène

a) Isolement et identification du virus

L'isolement du virus n'est habituellement pas nécessaire pour faire le diagnostic.

L'isolement du virus à partir d'un cheval suspect peut se faire par inoculation du sang à des cultures de leucocytes préparées à partir de chevaux indemnes. La présence du virus en culture peut être confirmée par détection de l'antigène AIE par ELISA (16), par immunofluorescence (20), par des techniques moléculaires ou par inoculation à des chevaux indemnes. L'isolement viral est rarement employé à cause des difficultés d'obtention de cultures de leucocytes équins.

Lorsque le statut infectieux d'un cheval ne peut pas être déterminé clairement, on peut avoir recours à l'inoculation du sang de l'animal suspect à un cheval indemne. Dans ce cas, on utilise un cheval fournissant une réponse sérologique négative et après l'injection, on suit son statut sérologique et son état clinique pendant au moins 45 jours. Habituellement, 1 à 25 ml de sang injectés immédiatement par voie veineuse sont suffisants pour révéler l'infection, mais dans de rares cas il peut être nécessaire d'utiliser un volume supérieur de sang (250 ml) ou de leucocytes lavés provenant d'un tel volume (5).

b) Épreuve d'amplification en chaîne par polymérase

Une épreuve d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) nichée a été décrite qui détecte l'ADN proviral du virus de l'AIE à partir du sang périphérique des chevaux (13). La technique de PCR nichée est basée sur des amorces spécifiques de la région *gag* du génome proviral. Elle s'est révélée sensible pour détecter les souches du virus sauvage à partir des globules blancs de chevaux infectés ; la limite inférieure de détection est d'environ 10 copies d'ADN du génome cible (13, 14). Une PCR en temps réel associée à une transcription inverse a aussi été décrite (8). Pour confirmer les résultats de ces techniques très sensibles, il est recommandé de dupliquer les échantillons à tester. En raison des risques de contamination croisée, les protocoles appropriés doivent aussi être appliqués. Les méthodes de validation des tests PCR sont présentées en détail dans le Chapitre 1.1.5. de ce *Manuel terrestre*.

La détection du virus de l'AIE par PCR peut être mise en œuvre dans les circonstances suivantes :

- Résultats des tests sérologiques en désaccord ;
- Résultats sérologiques négatifs ou douteux en cas de suspicion d'infection ;
- Tests complémentaires pour confirmer des tests sérologiques positifs ;
- Confirmation d'une infection précoce avant apparition des anticorps ;

- Vérification que les chevaux utilisés pour la production d'antisérums, de vaccins ou donneurs de sang sont bien indemnes de l'infection par le virus de l'AIE ;
- Confirmation du statut de poulains nés de mères infectées.

2. Épreuves sérologiques

En raison de la persistance du virus de l'AIE chez les équidés infectés, une réponse sérologique positive confirme l'infection d'un sujet par le virus de l'AIE.

a) Épreuve d'immunodiffusion en gélose (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Lors d'infection par le virus de l'AIE, des anticorps précipitants sont rapidement produits et peuvent être détectés par l'épreuve d'IDG. Une réaction spécifique est attestée par la formation d'une ligne de précipité entre l'antigène AIE et le sérum testé et elle est confirmée par son identité avec la ligne de précipité apparaissant entre l'antigène et le sérum positif de référence. Au cours des 2 à 3 semaines suivant l'infection, les chevaux fournissent habituellement une réponse sérologique négative. Dans de rares cas, le délai d'apparition des anticorps après l'infection peut aller jusqu'à 60 jours.

Plusieurs compagnies fournissent les réactifs pour l'épreuve d'IDG. Par ailleurs, l'antigène pour IDG et le sérum de référence peuvent être préparés comme décrit ci-dessous.

• Préparation de l'antigène

L'antigène spécifique de l'AIE peut être préparé à partir de la rate d'un cheval infecté de façon aiguë (6), de culture cellulaire équine infectée (11), d'une lignée cellulaire de thymus canin infectée de façon persistante (3) ou des protéines exprimées par des bactéries ou des baculovirus en utilisant la technique de l'ADN recombinant (2, 10). La préparation à partir de cultures infectées ou par une technique d'ADN recombinant donne un résultat plus régulier que les rates infectées et permet une meilleure normalisation des réactifs.

Pour obtenir un antigène satisfaisant à partir de la rate, un cheval doit être infecté avec une souche très virulente du virus de l'AIE. La période d'incubation doit être de 5 à 7 jours et la rate doit être prélevée au 9^e jour, quand le titre viral est maximal et avant l'apparition des anticorps précipitants. La pulpe splénique non diluée est utilisée comme antigène (6). L'extraction d'antigène à partir de la rate avec une solution saline et la concentration avec du sulfate d'ammonium ne fournissent pas un antigène aussi bon que la sélection d'une rate ayant un très haut titre en antigène AIE.

Autrement, on peut infecter des cellules rénales de fœtus de cheval, des cellules dermiques ou des cellules de thymus de chien avec une souche de virus de l'AIE adaptée à la culture cellulaire (*American Type Culture Collection*). Le virus est récolté des cellules par précipitation avec une solution de 8 p. cent de polyéthylène glycol ou par ultracentrifugation. L'antigène de diagnostic, p26, est récupéré du virus par traitement avec un détergent ou l'éther (11). Les protéines virales de l'AIE exprimées par des bactéries ou un baculovirus sont disponibles dans le commerce et sont utilisables comme antigène de grande qualité pour le diagnostic sérologique.

La p26 est une protéine structurale interne du virus codée par le gène *gag*. Au sein des souches de virus de l'AIE, la p26 est plus stable au plan antigénique que les glycoprotéines gp45 et gp90 (12). On a décrit des variations dans la séquence des acides aminés de p26 en fonction de la souche ; cependant, il n'a pas été démontré que cela influençait les résultats des épreuves du diagnostic sérologique (21).

• Préparation du sérum positif de référence

Un sérum positif peut être récolté chez un cheval infecté par le virus de l'AIE. Ce sérum doit fournir une ligne dense de précipité spécifique de l'AIE, comme le démontre une réaction d'identité avec un sérum de référence connu. Il est important d'équilibrer les concentrations de l'antigène et de l'anticorps afin d'obtenir une sensibilité optimale de l'épreuve. Ces concentrations doivent être ajustées de façon à obtenir une ligne étroite de précipité située approximativement à égale distance des puits contenant l'antigène et le sérum.

• Protocole (1, 6, 15)

- i) Les réactions d'immunodiffusion sont effectuées dans de la gélose en boîtes de Petri. Pour des boîtes de Petri de 100 mm de diamètre, on utilise 15 à 17 ml de gélose Noble à 1 % dans du tampon boraté 0,145 M (9 g de H₃BO₃ + 2 g de NaOH par litre), à pH 8,6 (± 0,2). Six puits de même diamètre sont creusés dans la couche de gélose, 1 central et 6 périphériques. Les puits ont 5,3 mm de diamètre et sont distants de 2,4 mm. Chaque puits doit contenir le même volume de réactif.

- ii) L'antigène est placé dans le puits central et le sérum positif de référence en alternance dans les puits périphériques. Les sérums à tester sont placés dans les 3 puits restants.
- iii) Les boîtes sont conservées à température du laboratoire en atmosphère humide.
- iv) Après 24 à 48 h, les réactions de précipitation sont examinées à l'aide d'un éclairage donnant un faisceau étroit de lumière intense oblique, sur un fond noir. Les lignes de précipité de référence doivent être clairement visibles à 24 h, et à ce moment tout sérum fortement positif peut également avoir produit une ligne de précipité montrant une réaction d'identité avec celle située devant les réactifs de référence. Une réaction faiblement positive peut demander 48 h pour être visible et ne se traduit que par une légère inflexion de la ligne de précipité de référence du puits voisin. Un sérum contenant beaucoup d'anticorps précipitants peut former une ligne large et floue. Une telle réaction peut être confirmée comme spécifique de l'AIE en retestant le sérum après dilution au 1/2 et au 1/4 ; ces dilutions donnent une ligne de précipité mieux visible dans la réaction d'identité. Les sérums dépourvus d'anticorps de l'AIE ne forment pas de ligne de précipité et n'ont pas d'effet sur les lignes de précipité de référence des puits voisins.
- v) *Interprétation des résultats.* Des chevaux en début d'infection peuvent fournir une réponse négative à l'épreuve d'IDG. Le sérum de tels animaux devra être testé de nouveau 3 à 4 semaines plus tard. Pour effectuer un diagnostic chez un poulain, il est nécessaire de déterminer le statut sérologique de sa mère. Si la mère transmet des anticorps de l'AIE à son poulain par le colostrum, une période de 6 mois après la naissance, voire davantage, peut être nécessaire pour l'élimination des anticorps maternels. Un contrôle sérologique mensuel du poulain peut être utile pour constater une diminution des anticorps maternels. Pour conclure que le poulain n'est pas infecté, il faut obtenir un résultat négatif (après la réponse positive initiale) au moins 2 mois après la séparation du poulain d'avec sa mère infectée ou de tout autre cheval infecté. Une méthode alternative consiste à réaliser une PCR sur le sang du poulain pour contrôler l'absence ou la présence du provirus de l'AIE.

b) Épreuve immuno-enzymatique

Quatre ELISA ont été agréés par le Département de l'agriculture des États-Unis d'Amérique pour le diagnostic de l'AIE et sont disponibles au plan international : un ELISA de compétition et 3 autres ELISA qui ne sont pas de compétition (conventionnels). L'ELISA de compétition et deux autres ELISA conventionnels détectent les anticorps produits par la protéine p26. Le troisième ELISA utilise à la fois l'antigène p26 et l'antigène gp45 (protéine virale transmembranaire). Les protocoles classiques ELISA sont utilisés pour tous ces tests. Lorsque le matériel ELISA commercial n'est pas disponible, on peut utiliser de l'antigène p26 provenant de culture cellulaire (16).

Tout sérum ayant fourni une réponse ELISA positive doit être étudié par IDG afin de confirmer le diagnostic, car quelques réponses faussement positives ont été obtenues en ELISA. Le résultat positif peut également être confirmé par immunoblot. Un sérum étalon international, qui contient la quantité minimale d'anticorps devant être détectée par les laboratoires, est disponible auprès de Laboratoires de référence de l'OIE (se reporter à la liste dans la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Des méthodes uniformes de lutte contre l'AIE ont été publiées (19).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Aucun produit biologique n'est actuellement disponible pour l'AIE.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR) (2000). Animal Health Analysis Methods. Detection of Antibodies against Equine Infectious Anaemia by the Agar Gel Immunodiffusion Test. NF U 47-002. AFNOR, 11 avenue Francis de Pressensé, 93571 Saint-Denis La Plaine Cedex, France.
2. ARCHAMBAULT D., WANG Z., LACAL J.C., GAZIT A., YANIV A., DAHLBERG J.E. & TRONICK S.R. (1989). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for equine infectious anaemia virus detection using recombinant Pr55gag. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1167–1173.
3. BOUILLANT A.M.P., NELSON K., RUCKERBAUER C.M., SAMAGH B.S. & HARE W.C.D. (1986). The persistent infection of a canine thymus cell line by equine infectious anaemia virus and preliminary data on the production of viral antigens. *J. Virol. Methods*, **13**, 309–321.

4. CHEEVERS W.M. & MCGUIRE T.C. (1985). Equine infectious anaemia virus; immunopathogenesis and persistence. *Rev. Infect. Dis.*, **7**, 83–88.
5. COGGINS L. & KEMEN M.J. (1976). Inapparent carriers of equine infectious anaemia (EIA) virus. *In: Proceedings of the IVth International Conference on Equine Infectious Diseases*. University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA, 14–22.
6. COGGINS L., NORCROSS N.L. & KEMEN M.J. (1973). The technique and application of the immunodiffusion test for equine infectious anaemia. *Equine Infect. Dis.*, **III**, 177–186.
7. COGGINS L., NORCROSS N.L. & NUSBAUM S.R. (1972). Diagnosis of equine infectious anaemia by immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.*, **33**, 11–18.
8. COOK R.F., COOK S.J., LI F.L., MONTELARO R.C., & ISSEL C.J. (2002). Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *Viral Methods*, **105**, 171–179.
9. KEMEN M.J. & COGGINS L. (1972). Equine infectious anaemia: transmission from infected mares to foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **161**, 496–499.
10. KONG X. K., PANG H., SUGIURA T., SENTSUI H., ONODERA T., MATSUMOTO Y. & AKASHI H. (1997). Application of equine infectious anaemia virus core proteins produced in a Baculovirus expression system, to serological diagnosis. *Microbiol. Immunol.*, **41**, 975–980.
11. MALMQUIST W.A., BARNETT D. & BECVAR C.S. (1973). Production of equine infectious anaemia antigen in a persistently infected cell line. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **42**, 361–370.
12. MONTELARO R.C., PAREKH B., ORREGO A. & ISSEL C.J. (1984). Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anaemia, a retrovirus. *J. Biol. Chem.*, **16**, 10539–10544.
13. NAGARAJAN M.M. & SIMARD C. (2001). Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **94**, 97–109.
14. NAGARAJAN M.M. & SIMARD C. (2007). Gag genomic heterogeneity of equine infectious anemia virus (EIAV) in naturally infected horses in Canada: implication on EIA diagnosis and peptide-based vaccine development. *Virus Res.*, **129**, 228–235.
15. PEARSON J.E. & COGGINS L. (1979). Protocol for the immunodiffusion (Coggins) test for equine infectious anaemia. *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians*, **22**, 449–462.
16. SHANE B.S., ISSEL C.J. & MONTELARO R.C. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 351–355.
17. SUZUKI T., UEDA S. & SAMEJIMA T. (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet. Microbiol.*, **7**, 307–316.
18. TOMA B. (1980). Réponse sérologique négative persistante chez une jument infectée. *Rec. Med. Vet.*, **156**, 55–63.
19. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE (2002). Equine Infectious Anemia Uniform Methods and Rules. <http://www.aphis.usda.gov/oa/pubs/eiaumr.pdf>
20. WEILAND F., MATHEKA H.D. & BOHM H.O. (1982). Equine infectious anaemia: detection of antibodies using an immunofluorescence test. *Res. Vet. Sci.*, **33**, 347–350.
21. ZHANG W., AUYONG D.B., OAKS J.L. & MCGUIRE T.C. (1999). Natural variation of equine infectious anemia virus Gag-protein cytotoxic T lymphocyte epitopes. *Virology*, **261**, 242–252.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour l'anémie infectieuse des équidés (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).

CHAPITRE 2.5.7.

GRIPPE ÉQUINE

RÉSUMÉ

La grippe équine est une maladie respiratoire des chevaux, ânes et mules causée par 2 sous-types distincts de virus grippaux (H7N7 précédemment equi-1 et H3N8 précédemment equi-2) appartenant au genre Influenza virus A et à la famille des Orthomyxoviridés. Les virus du sous-type H7N7 n'ont pas été isolés depuis la fin des années 1970. Des infections chez les zèbres, les chiens et les humains ont aussi été signalées. Chez les équidés totalement sensibles, les signes cliniques comprennent de la fièvre et une toux sèche et forte, suivie d'un jetage nasal mucopurulent ; des signes nerveux ont aussi été décrits mais rarement. Chez les animaux vaccinés partiellement immuns, un ou plusieurs signes cliniques précédents peuvent manquer. De façon caractéristique, la grippe s'étend rapidement au sein d'une population sensible. Bien que normalement confiné aux équidés, le sous-type H3N8 a traversé la barrière d'espèce et peut infecter les chiens. L'infection se traduit normalement par une fièvre modérée et de la toux, mais elle peut parfois entraîner une pneumonie fatale. Alors qu'aucune maladie humaine n'a jamais été rapportée au virus de la grippe équine, des preuves sérologiques ont été trouvées. Le diagnostic des infections dues au virus de la grippe repose sur l'isolement du virus ou la détection d'antigènes et/ou du génome, à partir de chevaux en phase de maladie respiratoire aiguë ou sur la mise en évidence d'une réponse sérologique à l'infection. Dans l'idéal les deux méthodes sont mises en œuvre. La maladie est enzootique dans la plupart des pays dans lesquels vit une population importante de chevaux. Au cours des dernières années, la grippe équine a été introduite en Australie et ré-introduite en Afrique du Sud et au Japon ; à l'heure actuelle, la Nouvelle-Zélande et l'Islande sont déclarées indemnes de la maladie. De nombreuses infections ont été signalées chez des chiens en Amérique du Nord, à la suite d'une transmission croisée entre espèces et d'une transmission intra-spécifique par la suite.

Identification de l'agent pathogène : des œufs embryonnés de poule et/ou des cultures cellulaires peuvent être utilisés pour l'isolement du virus à partir d'écouvillonnages nasaux ou de liquides de lavage nasal ou trachéal. La multiplication du virus est révélée par la mise en évidence d'une capacité hémagglutinante (HA) ou en culture cellulaire par une hémadsorption (HAD) à l'aide de globules rouges de poule ou de cobaye. Les isolats peuvent être caractérisés par réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IH) à l'aide d'antisérums spécifiques. Les isolats doivent toujours être adressés immédiatement à un Laboratoire international de référence (de l'OIE ou de l'Organisation mondiale de la santé [OMS]). Les échantillons qui se sont révélés négatifs doivent faire l'objet de passages successifs ; jusqu'à 5 passages successifs peuvent être nécessaires pour isoler le virus à partir de chevaux vaccinés. L'infection peut aussi être mise en évidence par la détection de l'antigène viral dans les sécrétions de l'appareil respiratoire à l'aide d'une méthode immuno-enzymatique (ELISA).

Épreuves sérologiques : le diagnostic de la grippe équine ne repose souvent que sur la base d'épreuves effectuées sur des couples de sérums. Le premier échantillon doit être recueilli aussitôt que possible après le début des signes cliniques et le second environ 2 semaines après. Le titre des anticorps est déterminé par IH ou par hémolyse radiale (SRH).

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : l'extension de l'infection et la gravité des signes cliniques peuvent être réduites par des vaccins inactivés efficaces contre la grippe équine et contenant les souches de virus adéquates. Les vaccins inactivés contre la grippe équine sont constitués de virus entier ou de ses sous-unités. Cependant, les chevaux vaccinés et infectés par un virus sauvage peuvent toujours être excréteurs du virus. Les virus vaccinaux sont multipliés sur œuf embryonné ou en culture cellulaire, concentrés

et purifiés avant inactivation par des agents tels que le formol ou la bêta-propiolactone. Les vaccins confèrent une protection en induisant une immunité humorale à l'égard de l'hémagglutinine. Les réponses sont généralement de courtes durées et l'administration de doses répétées est nécessaire pour maintenir des niveaux protecteurs d'anticorps. Des vaccins à virus vivant et des vaccins recombinants ont été récemment autorisés dans certains pays.

Les vaccins contre la grippe équine sont largement disponibles et sont utilisés en routine chez les chevaux de compétition en Europe, aux Amériques et en Asie. Dans certains pays la vaccination est obligatoire pour les chevaux de sport qui participent à des compétitions relevant des organismes équestres. Les vaccins sont peu utilisés dans le sous-continent indien, en Chine, en Australie ou en Nouvelle-Zélande, cette dernière région étant restée indemne de la maladie.

Après une première administration de 3 doses vaccinales séparées par un premier intervalle de 1 mois suivi d'un second de 6 mois, il est prescrit au minimum une injection annuelle de rappel. Dans certaines régions les vaccinations sont répétées tous les 3 à 6 mois. Les vaccinations des poulains nés de juments correctement vaccinées ne devraient pas être pratiquées avant l'âge de 6 à 9 mois, afin que les anticorps d'origine maternels aient eu le temps de disparaître ; une vaccination plus précoce risquerait d'induire un état de tolérance et, au long terme, une faible réponse immunitaire. Les poulains sans anticorps d'origine maternelle peuvent être vaccinés plus jeunes en particulier en période de risque élevé.

L'immunité produite par les vaccins inactivés ou les vaccins recombinants qui ne se répliquent pas, dépend de l'induction d'anticorps dirigés contre l'hémagglutinine (HA), et la protection due au vaccin est bien corrélée avec les taux d'anticorps-anti HA circulants. En revanche, l'immunité induite par une infection ou les vaccins à virus vivants atténués ne dépend pas de la présence d'anticorps circulants, et la participation des immunités de type cellulaire ou des muqueuses est vraisemblable.

Des défaillances de protection vaccinale ont souvent été signalées et attribuées à un manque d'activité du vaccin, à des stratégies vaccinales inadaptées et à des vaccins anciens rendus obsolètes par les dérivés antigéniques. Un test d'activité in vitro (Immunodiffusion radiale) peut être pratiqué pour contrôler le pouvoir antigénique du produit inactivé avant adjonction d'un adjuvant. Pour les vaccins à virus vivants ou les vaccins recombinants, les tests en cours de fabrication reposent sur le titrage du virus infectieux. Un programme de surveillance est en cours afin de contrôler la dérive antigénique au sein des virus de la grippe équine et fournir des informations nécessaires à la sélection des souches vaccinales.

A. INTRODUCTION

La grippe équine est causée par deux sous-types : H7N7 (précédemment sous-type 1) et H3N8 (précédemment sous-type 2) de virus de la grippe (genre *Influenza virus A*, famille des *Orthomyxoviridés*) ; cependant, très peu d'infections par le sous-type H7N7 ont été signalées au cours des 20 dernières années (15, 29). Bien qu'ils ne soient pas pathogènes pour l'homme celui-ci peut être infecté par l'un ou l'autre sous-type du virus de la grippe équine. De telles infections sont rares et subcliniques, mais peuvent représenter un danger potentiel pour le personnel travaillant en laboratoire (1).

Chez les équidés pleinement sensibles, les signes cliniques comprennent la fièvre, une toux sèche et dure ; ont aussi été décrites, mais rarement, une pneumonie chez les poulains et les ânes ainsi qu'une encéphalite chez les chevaux (7, 10). Chez les chiens, l'infection se traduit également par de la fièvre et de la toux ; parfois, elle entraîne une bronchopneumonie suppurée et une mort rapide (4). Classiquement, la grippe équine se répand rapidement dans une population pleinement sensible, mais chez les animaux vaccinés et partiellement immuns, un ou plusieurs signes cliniques peuvent manquer, et l'extension de la maladie dans une population vaccinée peut être limitée (6). Cela rend le diagnostic clinique de la grippe équine d'autant plus difficile que d'autres maladies virales, comme l'infection à herpèsvirus équin, peuvent ressembler cliniquement à une forme bénigne de la grippe équine. Les chevaux infectés par le virus de la grippe équine sont particulièrement sensibles aux infections bactériennes secondaires et peuvent présenter un jetage mucopurulent, ce qui peut orienter le diagnostic vers une infection bactérienne et faire ignorer la cause sous-jacente. La vaccination n'entraîne pas d'immunité dite « stérile » ; les chevaux vaccinés peuvent héberger le virus et contribuer ainsi à l'extension de l'infection. Des stratégies basées sur une gestion appropriée du risque tenant compte de cette possibilité doivent être établies.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Le diagnostic des infections dues au virus de la grippe repose sur l'isolement du virus à partir de chevaux en phase de maladie respiratoire aiguë ou sur la mise en évidence d'une réponse sérologique à l'infection. Dans l'idéal les deux méthodes sont mises en œuvre. L'infection peut aussi être mise en évidence par la détection de l'antigène viral dans les sécrétions de l'appareil respiratoire à l'aide d'une méthode immuno-enzymatique (ELISA), ou par la détection du génome viral par une épreuve d'amplification en chaîne par polymérase (PCR). Tous les virus de la grippe équine sont hautement contagieux pour les hôtes sensibles y compris l'œuf de poule embryonné et les cultures cellulaires. Des précautions doivent être prises pendant la manipulation des œufs infectés afin d'éviter des contaminations accidentelles (28). Les souches de référence ne doivent pas être multipliées dans les laboratoires de diagnostic et, pour le moins, jamais en même temps ou aux mêmes endroits que là où sont traités des échantillons de diagnostic. Tous les emplacements de travail doivent être désinfectés efficacement avant et après manipulation du virus qui doit être effectuée de préférence dans des enceintes de sécurité.

Il est important de recevoir les échantillons aussitôt que possible après le début des signes cliniques, de préférence en 3 à 5 jours. Ces échantillons comprennent des écouvillonnages nasaux et des liquides de lavage nasaux ou trachéaux, qui pour ces derniers sont effectués sous endoscopie. Les écouvillons sont constitués de coton absorbant, d'ouate ou de gaze, fixés sur une tige et doivent être de longueur suffisante pour être introduits par la face ventrale de la narine dans le nasopharynx. Les écouvillons sont transférés immédiatement après usage dans un tube contenant du milieu de transport. Le milieu de transport est constitué de solution physiologique tamponné au phosphate (PBS) contenant soit 40 % de glycérol soit 2 % de milieu tryptose phosphate, 2 % de solution antibiotique (pénicilline [10 000 unités], streptomycine [10 000 unités] dans 100 ml d'eau distillée stérile) et 2 % de fungizone (250 mg/ml). Si les échantillons doivent être inoculés dans les 1 à 2 jours qui suivent, ils peuvent être maintenus à 4 °C, mais s'ils sont gardés plus longtemps, ils doivent être conservés à -70 °C ou en dessous. Il est préférable par ailleurs que les prélèvements soient transportés sur glace.

Les échantillons doivent être préparés un par un. Le liquide est exprimé à l'aide de pinces de l'écouvillon qui est alors jeté en respectant les règles d'hygiène. Il peut être ajouté, par la suite, des antibiotiques, si l'échantillon apparaît être fortement contaminé par des bactéries. Ce liquide récolté est conservé à -70 °C. Les échantillons traités avec des antibiotiques peuvent être maintenus dans la glace pendant 30 à 60 min, ils sont alors centrifugés à 1 500 *g* pendant 15 min afin d'éliminer les bactéries et les débris ; les surnageants sont utilisés pour l'inoculation. La filtration des échantillons n'est pas recommandée parce que le virus Influenza peut être adsorbé sur le filtre et ainsi disparaître de l'échantillon.

1. Identification de l'agent pathogène

L'isolement du virus infectieux peut être réalisé sur œuf de poule embryonné ou sur culture cellulaire et l'acide nucléique viral peut être identifié par PCR. Traditionnellement, on préfère l'inoculation à l'œuf pour l'isolement du virus de la grippe équine. La comparaison des virus H3N8 isolés sur œuf ou sur cellules de rein de chien Darby (MDCK pour *Madin-Darby Canine Kidney*) montre que les cellules MDCK peuvent sélectionner des variants viraux qui ne sont pas représentatifs du virus prédominant dans l'échantillon clinique (11). Cependant, au cours des dernières années quelques virus ont été isolés avec succès en cellules MDCK mais pas sur œuf et la sélection des variants s'est faite par culture sur œuf (24) ; les isollements peuvent par conséquent être réalisés sur l'un ou l'autre support. Des techniques de PCR ont été décrites pour l'identification du virus de la grippe équine à partir d'échantillons cliniques et pour les études d'épidémiologie moléculaire (8, 13, 23).

Dans le cas où il n'est pas possible de réaliser une isolation du virus pour cause d'installation/équipement non disponible, la nucléoprotéine du virus H3N8 peut être détectée directement dans les sécrétions nasales par un ELISA de capture utilisant un anticorps dirigé contre cette antigène (3, 14). Des kits complets de diagnostic pour la grippe humaine sont commercialisés et ils peuvent être utilisés pour la détection de l'antigène du virus de la grippe équine (2). Cette approche fournit un résultat rapide à partir duquel une décision peut être prise. Cette méthode ne doit cependant pas être préférée à l'isolement du virus. En effet, il est essentiel que les nouveaux virus soient isolés et envoyés aux laboratoires de référence pour être identifiés dans le cadre du programme de surveillance des dérives antigéniques et de l'émergence de nouveaux virus mais également pour fournir les isolats qui permettront la production de vaccins efficaces. Des résultats positifs à l'ELISA doivent être exploités pour un dépistage rapide parmi les échantillons si les ressources sont limitées ou pour la sélection des échantillons qui seront envoyés au laboratoire de référence pour une isolation du virus.

a) Isolement du virus sur œuf de poule embryonné

Des œufs fécondés sont placés dans un incubateur à 37-38 °C et retournés deux fois par jour. Après 10 à 11 jours ils sont examinés par transillumination. Seuls les œufs embryonnés vivants sont conservés. La surface de l'œuf au-dessus du sac aérien est nettoyée à l'alcool et un petit orifice est percé à travers la

coquille. Plusieurs œufs sont inoculés avec le même échantillon. Les œufs sont inoculés avec 0,1 ml d'échantillon déposés dans la cavité amniotique, puis l'aiguille est retirée d'environ 1 cm, et 0,1 ml sont à nouveau déposés dans la cavité allantoïdienne. Il est aussi possible de procéder en inoculant uniquement dans la cavité allantoïdienne à travers un trou percé juste en dessous de la ligne du sac aérien. L'orifice est scellé avec de la paraffine ou un ruban adhésif et les œufs sont incubés à 34-35 °C pendant 3 jours. Les œufs dont les embryons meurent dans les 24 h sont éliminés. Les œufs dont les embryons survivent au-delà de 24 h ou qui vivent encore au bout de 3 jours sont examinés pour rechercher la présence de virus de la grippe équine.

Les œufs sont ensuite placés à 4 °C pendant 4 h ou une nuit afin de tuer les embryons et réduire le saignement lors de la récolte du matériel à tester. Les coquilles sont désinfectées et les liquides amniotiques ou allantoïdiens récoltés séparément à la pipette. La présence d'un pouvoir hémagglutinant est ensuite recherchée en mélangeant les liquides récoltés à volume égal (0,025 ml) avec des globules rouges (GR) de poule (0,5 % v/v de culot globulaire re-suspendu en PBS) ou une suspension à 4 % de GR de cobaye (0,4 % v/v de culot globulaire re-suspendu en PBS) dans les cupules de microplaques à fond en U ou en V. Si on utilise des GR de poule, il est possible de lire les plaques en les inclinant à 70° pour observer si les érythrocytes non agglutinés coulent au fond de la cupule. Les GR de cobaye se présentent comme des boutons au fond des cupules et peuvent mettre plus de temps à se déposer. En absence d'activité HA, des aliquots de chaque récolte sont mélangés et font l'objet d'un nouveau passage sur œufs. Tous les échantillons présentant une activité hémagglutinante sont répartis en aliquots et stockés à -70 °C. L'activité HA d'un des aliquots est titrée immédiatement. Si le titre HA est supérieur ou égal au 1/16, l'isolat doit être immédiatement identifié. Si le titre est bas, des passages supplémentaires doivent être réalisés. Il faut prendre soin d'éviter l'apparition de particules défectives susceptibles d'interférences en pré-diluant l'inoculum au 1/10, 1/100, 1/1 000. Les échantillons positifs provenant de plus fortes dilutions doivent être sélectionnés comme stocks à conserver. Il peut être nécessaire de réaliser jusqu'à 5 passages pour isoler le virus notamment à partir d'animaux vaccinés. Si aucun virus n'a été isolé au cinquième passage, il est peu probable d'en isoler à partir d'un nombre de passages supérieur.

b) Isolement du virus en cultures cellulaires

Des cultures de cellules MDCK (MDCK ATCC CCL34) peuvent être utilisées pour isoler le virus de la grippe équine. Les cellules sont multipliées en tube jusqu'à confluence puis chaque échantillon est inoculé en triple à la dose de 0,25 à 0,5 ml par tube comme décrit ci-dessus. Avant l'inoculation, les tapis cellulaires sont lavés au moins 1 fois avec du milieu de culture sans sérum, mais contenant de la trypsine (2 µg/ml). Les cultures sont maintenues en milieu de culture sans sérum en présence de trypsine à la concentration 0,5 à 2 µg/ml (traitée à la TPCK [L-1-tosylamine-2-phényléthyl chlorométhyl cétone] afin d'éliminer la chymotrypsine éventuellement présente avant traitement comme par exemple dans les produits Sigma) et examinées tous les jours pour recherche d'un effet cytopathogène (ECP). En cas de positivité ou dans tous les cas après 7 jours, les surnageants sont testés vis-à-vis de l'activité HA. Les surnageants d'un titre supérieur ou égal à 1/16 font l'objet d'une identification immédiate. Les surnageants négatifs et ceux d'un titre inférieur à 1/16 font l'objet de passages supplémentaires jusqu'à 5 passages.

Une autre façon de procéder est la mise en évidence d'un phénomène d'hémadsorption (HAD). Cette technique permet de détecter l'expression d'antigènes viraux à la surface des cellules. Le milieu de culture est rejeté et les cultures en tube lavées au PBS. Une ou deux gouttes de GR de poule ou de cobaye à la concentration 50 % sont ajoutées à chaque tube, lesquels sont tournés doucement et placés à température ambiante (23 °C [\pm 2 °C]) pendant 30 min. Les GR, qui ne sont pas fixés, sont retirés par lavage avec du PBS et les cultures sont examinées au microscope pour recherche d'HAD.

c) Typage de l'hémagglutinine

Le sous-type HA des virus de grippe équine nouvellement isolés est déterminé par inhibition de l'hémagglutination (IH ; section B.2.a) en utilisant des sérums spécifiques anti-H7N7 et H3N8. Les isolats peuvent être traités directement par le Tween 80/éther afin de détruire l'infectiosité virale et réduire les risques de contamination croisée. Dans le cas des virus H3N8 en particulier, ce traitement augmente l'activité HA (12). Toutefois le traitement au Tween 80/éther peut augmenter la variabilité des résultats. Les antigènes de référence doivent être titrés en parallèle et comprendre des souches du sous type H7N7 (par exemple la souche A/eq/Prague/56 ou A/eq/Newmarket/77) et des souches du sous-type H3N8 (par exemple A/eq/Newmarket/2/93, et A/eq/Kentucky94). Les souches de virus peuvent être obtenues auprès des Laboratoires de référence de l'OIE (se reporter à la liste donnée dans la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). De plus, lorsqu'ils sont disponibles, il faut inclure dans les tests des isolats récents en provenance des mêmes régions géographiques. Les antigènes de référence doivent être traités au Tween 80/éther afin d'éviter les contaminations croisées. Les antigènes testés et les antigènes de référence doivent être titrés de nouveau afin de confirmer leur teneur antigénique.

Les nouveaux isolats de grippe équine peuvent être ultérieurement caractérisés par IH en utilisant des sérums spécifiques de souche. L'espèce animale sur laquelle sont produits les anticorps peut influencer le pouvoir de réactivité croisée des sérums, les sérums de furet étant les plus spécifiques (17).

Tous les isolats doivent être envoyés immédiatement à un Laboratoire de référence international désigné par l'OIE ou l'Organisation mondiale de la santé (OMS), pour inclusion dans le programme de surveillance mis en place afin de détecter les dérives antigéniques et l'émergence de nouveaux virus.

d) Typage de la neuraminidase

Le typage de la neuraminidase nécessite des antisérums spécifiques et il n'existe pas de technique utilisable en routine. Le typage peut être réalisé avec des amorces de PCR.

e) Réaction d'amplification en chaîne par polymérase

Des épreuves PCR sont de plus en plus utilisées dans la détection du génome du virus de la grippe équine dans les sécrétions nasales. Une transcription inverse couplée à une PCR en temps réel s'est révélée plus sensible pour la détection d'échantillons positifs que la culture de virus en œufs ou la détection de la nucléoprotéine par ELISA (26). Même si la séquence génétique des isolats peut être obtenue par les tests PCR, il est néanmoins essentiel d'isoler les virus afin d'étudier les propriétés et les dérives antigéniques.

2. Épreuves sérologiques

Les infections peuvent être mises en évidence à l'aide d'épreuves sérologiques sur des sérums couplés montrant une élévation des titres d'anticorps. Ces épreuves doivent être pratiquées qu'il y ait tentative ou non d'isolement de virus. Il existe 2 méthodes simples l'IH et l'hémolyse radiale (SRH) toutes deux également efficaces et largement utilisées. La fixation du complément (FC) peut aussi être utilisée, mais n'est habituellement pas pratiquée. Les 2 sérums couplés doivent être testés en parallèle en même temps afin de diminuer la variabilité. Les antigènes de référence sont décrits plus haut (section B.1.c). Si on peut en disposer, il faut inclure des isolats provenant de cas récents. Un sérum post-infectieux lyophilisé anti A/eq/Newmarket/77 (H7N7), A/eq/Newmarket/1/93 (Lignée américaine H3N8) et A/eq/ Newmarket/2/93 (Lignée européenne H3N8) peuvent être obtenus auprès du Laboratoire de référence de l'OIE de Newmarket (se reporter à la liste donnée dans la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Il a été attribué une valeur en SRH à ces sérums suite à une étude collective internationale et ils peuvent être utilisés comme sérums de référence dans cette épreuve.

a) Épreuve d'inhibition de l'hémagglutination

L'antigène est d'abord traité au Tween 80/éther afin d'augmenter la sensibilité de l'épreuve en particulier vis-à-vis des virus H3N8. L'épreuve est réalisée de préférence en micro plaques à l'aide d'un dispositif de dilution approprié. Un macro-test peut être utilisé dans lequel l'antigène est porté à un titre HA final de 1/8 par puits, les volumes de PBS sérum et antigènes étant de 0,5 ml. Les sérums sont traités au préalable afin d'éliminer les hémagglutinines non spécifiques et inactivés à 56 °C pendant 30 min. Les traitements préalables sont soit (a) le traitement au kaolin et l'adsorption sur GR, soit (b) le traitement au périodate de potassium, soit (c) l'enzyme de destruction des récepteurs de *Vibrio cholerae*. Le périodate de potassium ou l'enzyme de destruction des récepteurs de *V. cholerae* sont les traitements de choix. Les sérums traités sont dilués dans du PBS, une dose standard d'antigène est ajoutée (titre HA 1/4 par puits en microméthode) et le mélange est maintenu à température ambiante (23 °C ± 2 °C) pendant 30 min. Après avoir doucement mélangé, on ajoute des GRP et on lit le résultat 30 min plus tard. Le titre IH est donné par la plus haute dilution du sérum inhibant complètement la réaction d'hémagglutination. On peut utiliser soit des GR de poule (1 % v/v de culot globulaire) dans des plaques en V ou des GR de cobaye (0,5 % v/v de culot globulaire) dans des plaques en U ou en V. Si on utilise des GR de poule, les plaques peuvent être lues en inclinant à 70° les plaques afin de voir si les GR non agglutinés « coulent » au fond du puits. Les GR de cobaye non agglutinés se présentent comme un « bouton » au fond du puits et peuvent mettre plus de temps à se déposer. Une augmentation par quatre ou plus du titre observé sur deux sérums couplés indique une infection récente (28).

• **Traitement du virus au Tween 80 / éther**

- i) Ajouter 0,5 ml d'une suspension à 10 % (v/v) de Tween 80 en PBS à 39,5 ml de liquide allantoidien afin d'obtenir une concentration de 0,125 % (v/v) de Tween 80 ;
- ii) Après avoir doucement mélangé à température ambiante, ajouter 20 ml de diéthyl éther afin d'obtenir une concentration de 33,3 % par volume et agiter 15 min à 4 °C ;
- iii) Après avoir laissé les couches se séparer en laissant le tube immobile, reprendre la phase aqueuse contenant les particules virales fragmentées dans un flacon en verre non bouché hermétiquement et laisser l'éther en excès s'évaporer toute une nuit (12) ;

iv) Conserver le virus traité en aliquots à -70°C .

- **Titration de l'hémagglutinine**

- i) Déposer 25 μl de PBS dans tous les puits d'une rangée de microplaque ;
- ii) Déposer 25 μl de virus dans le premier puits (dilution 1/2) et titrer par dilutions successives en laissant le dernier puits comme témoin ;
- iii) Déposer 25 μl de PBS dans tous les puits ;
- iv) Déposer 50 μl de GR de poule dans chacun des puits. Laisser 30 min à 22°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$). Le titre HA est donné par la dernière dilution de virus donnant une HA partielle ;

- **Prétraitement des sérums au périodate de potassium**

- i) Mélanger un volume (150 μl) de sérum avec 2 volumes (300 μl) de périodate de potassium 0,016 M fraîchement préparé (0,38 g dans 100 ml de PBS) et laisser 15 min à 22°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) ;
- ii) Ajouter un autre volume de glycérol à 3 % en PBS afin de neutraliser l'excès de périodate, mélanger et laisser 15 min à température ambiante ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) ;
- iii) Inactiver le mélange dans un bain d'eau à 56°C pendant 30 min.

- **Protocole**

- i) Répartir 25 μl de PBS dans tous les puits d'une microplaque ;
- ii) Déposer 25 μl de sérum à tester dans le premier puits d'une rangée de 12 et titrer par dilutions successives en laissant le dernier puits comme témoin (1/8 à 1/512, le pré-traitement du sérum l'ayant amené à la dilution du 1/4) ;
- iii) Diluer l'antigène de façon qu'il contienne 4 unités HA (4 fois la dose minimale agglutinante c.à.d. le quart de son titre) ;
- iv) Déposer 25 μl d'antigène dans chaque puits et incuber 30 min à 22°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) ;
- v) Déposer 50 μl de GR de poule dans chaque puits. Laisser 30 min à 22°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) ;
- vi) Les plaques peuvent être lues en les inclinant à 70° afin que les GR non agglutinés « coulent » au fond du puits, l'absence d'agglutination correspond à un résultat positif.

b) Hémolyse radiale

Dans cette épreuve, l'antigène viral est fixé à des GR en suspension dans un gel d'agarose contenant du complément de cobaye (C'). Des puits sont percés dans le gel et remplis des sérums à tester. Les anticorps anti-grippe équine et le C' provoquent une lyse des GR couplés avec l'antigène et entraînent l'apparition d'une zone claire d'hémolyse autour du puits. La taille de cette zone est directement proportionnelle aux taux d'anticorps spécifiques présents dans le sérum à tester (16, 25, 27).

Des plaques spéciales pour immunodiffusion (MP Biomedical) peuvent être utilisées pour cette épreuve mais de simples boîtes de Petri conviennent également. Les GR de mouton sont recueillis en solution d'Alsever et lavés 3 fois. On peut utiliser du C' du commerce, sinon du sérum normal de cobaye convient également. Les antigènes sont constitués de liquides allantoidiens ou de préparations purifiées ; les souches utilisées sont les mêmes que pour l'épreuve d'IH. Les virus sont fixés aux GR par le périodate de potassium ou le chlorure de chrome. Les préparations de GR couplés avec l'antigène sont mélangés au C' dans une solution d'agarose (à basse température de fusion) à 1 % en PBS. Il est nécessaire de prendre toutes les précautions pour s'assurer que la température ne dépasse pas 42°C à aucun moment de la manipulation. Le mélange est coulé dans les plaques et laissé à reposer. Des puits de 3 mm de diamètre sont percés tous les 12 mm et à au moins 6 mm des bords de la plaque. De telles plaques peuvent être conservées à 4°C pendant au moins 12 semaines. Les plaques sont préparées pour chaque antigène.

Les sérums sont inactivés à 56°C pendant 30 min, mais aucun traitement supplémentaire n'est nécessaire. Les couples de sérum sont testés sur chaque plaque. Au moins un anti-sérum spécifique de chaque type doit être introduit comme témoin dans un puits de chaque plaque. Tous les sérums testés doivent être contrôlés sur une plaque témoin dans laquelle sont présents tous les composants de la réaction sauf l'antigène afin de mettre en évidence une hémolyse non spécifique. On peut aussi utiliser des plaques témoins préparées avec un virus différent tel que A/PR/8/34 (H1N1). Les sérums présentant un pouvoir hémolytique doivent faire l'objet d'un traitement préalable par absorption sur GR de mouton. Les zones de lyse doivent être claires et non translucides ou floues. Toutes les zones claires doivent être mesurées et la surface d'hémolyse calculée.

- **Préparation des réactifs**

- Solution saline HEPES* : NaCl 0,85 % (4,25 g/500 ml) ; HEPES 0,05 M (N-2-hydroxyéthylpipérazine, acide N-2-éthanesulfonique 5,95 g/500 ml) et azide de sodium à 0,02 %. Ajuster à pH 6,5 par NaOH.
- Solution saline HEPES/SAB* : comme la solution saline HEPES avec 0,2 % (v/v) de sérum albumine bovine (SAB).
- Solution stock de CrCl₃ (2,25 M) 6 g/ml* : pour chaque essai, préparer une solution extemporanée au 1/400 dans une solution de NaCl à 0,85 %.
- PBS (Londres)/PBS 'A'* : NaCl (10,00 g) ; KCl (0,25g) ; Na₂PO₄ (0,25 g) ; azide de Na (0,20 g). Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.
- Agarose en PBS* : placer un flacon contenant le PBS 'A' sur un agitateur. Ajouter doucement 10 g d'agarose à la solution en agitant, faire fondre dans un autocuiseur, répartir dans des bouteilles en verre pour conserver à 22 °C (± 2 °C).
- Antigène viral* : des liquides allantoïdiens infectieux sont récoltés et conservés à –70 °C. Une courbe de titrage permet de déterminer la concentration optimale d'antigène viral à utiliser pour la préparation de GR de moutons sensibilisés. Les virus H7N7 donnent toujours des zones d'hémolyse claires. Les souches de virus H3N8 donnent parfois des zones d'hémolyse floues ; il est nécessaire dans ce cas de concentrer le virus par centrifugation.
- Sang de mouton* : recueillir le sang dans un volume égal de solution d'Alsever et conserver à 4 °C. Il peut être nécessaire de saigner plusieurs moutons car il peut y avoir des variations individuelles des GR. Conserver le sang 2 jours avant utilisation, il peut être utilisé jusqu'à 3 semaines pour autant que la stérilité soit conservée.
- Complément* : utiliser le complément de cobaye qui est disponible dans le commerce ou collecter le sérum à partir de jeunes cobayes de 300 à 350 g et le conserver dans des petits volumes à –70 °C. Pour l'utiliser, décongeler dans de l'eau froide et le maintenir à 4 °C avant de le mélanger.
- Traitement des sérums* : utiliser le sérum non dilué inactivé à la chaleur à 56 °C pendant 30 min. Éviter les cycles répétés de congélation-décongélation.

- **Protocole**

- Laver les GR de mouton au moins 3 fois dans une solution saline HEPES ;
- Préparer un volume approprié de GR de mouton à 8 % (v/v de culot cellulaire) en solution saline HEPES en ayant au préalable calculé le nombre de plaques nécessaires et en prévoyant 1 ml par plaque de 6 × 11 cm plus 1 à 2 ml supplémentaires ;
- Ajouter un volume¹ pré-déterminé d'antigène viral à la solution de GR à 8 %. Conserver le mélange 10 min à 4 °C. Une hémagglutination peut se produire ;
- Ajouter LENTEMENT le CrCl₃ (1/400 dans une solution de NaCl à 0,85 %) à la moitié du volume de la suspension de virus/GR. Laisser 5 min à 22 °C (± 2 °C) en mélangeant de temps en temps ;
- Faire sédimenter les GR sensibilisés par centrifugation à 1 500 **g** pendant 5 min ;
- Remettre en suspension doucement en solution saline/HEPES/BSA et centrifuger à 1 500 **g** pendant 5 min ;
- Remettre les GR en suspension à 8 % dans une solution PBS 'A'.

Pendant la phase de sensibilisation mélanger l'agarose dans un autocuiseur Peu avant utilisation répartir des volumes de 7,8 ml en bouteilles à la pipette et conserver à 42 °C. Vérifier que l'agarose s'est refroidie en dessous de 42 °C avant utilisation.

- **Préparation des plaques**

- Ajouter 0,9 ml de GR de mouton sensibilisés au volume de 7,8 ml d'agarose (42 °C). Mélanger rapidement mais avec précautions ;
- Ajouter 0,3 ml de sérum de cobaye non dilué. Mélanger à nouveau et verser dans les immunoplaques posées sur une table à niveau. Laisser solidifier et sécher à l'air sans couvercle pendant 5 min ;

1 Préparer 3 plaques en ajoutant 0,6, 1,2 ou 1,8 ml d'antigène viral à 2 ml de GR. Ajouter respectivement 1,3, 1,6 et 1,9 ml de CrCl₃ et mettre de nouveau en suspension dans 2 ml de PBS 'A'. Le volume optimal de l'antigène viral est celui qui entraîne les zones de lyses les plus larges et les plus claires avec un sérum de référence approprié.

- iii) Placer les couvercles sur les plaques et conserver à 4 °C dans une chambre humide avant usage ;
- iv) Préparer les plaques témoins avec des GR non sensibilisés ou sensibilisés avec un virus différent. Les lots de plaques peuvent être conservés plusieurs semaines ;
- v) Percer des trous de 3 mm de diamètre dans les gels solidifiés d'une plaque en prévision de 16 sérums à tester et d'un sérum témoin. Sur la plaque d'antigène témoin préparer 5 rangées de 8 puits ;
- vi) Prélever à la pipette 10 µl de sérum à tester décomplémenté (56 °C pendant 30 min) et un sérum témoin positif dans les puits qui leur sont assignés. Laisser incuber 20 h à 34 °C en chambre humide ;
- vii) Mesurer les diamètres des zones d'hémolyse et calculer leurs surfaces après déduction de celles des puits.

- **Interprétation des résultats**

Pour que les résultats soient valides, il faut que ceux observés avec les sérums témoins négatifs et positifs concordent avec les prévisions et les observations précédentes. Les surfaces d'hémolyse des sérums témoins doivent être claires et les variations intra-laboratoires ne doivent pas excéder 5 % par rapport au sérum positif. Les résultats peuvent être exprimés en mm² ou par rapport à un sérum de référence. Les sérums apparaissant positifs dans la plaque de contrôle doivent être absorbés avec des GR de mouton. Dans un but de diagnostic, des sérums prélevés en phase aiguë et en phase de convalescence doivent être testés en parallèle sur la même plaque. L'augmentation de surfaces des zones d'hémolyses des sérums convalescents comparés avec la surface des sérums prélevés en phase aiguë est la preuve d'une infection. L'augmentation doit être significative selon la reproductibilité de l'épreuve au laboratoire mais il doit équivaloir à un doublement ou plus de la concentration des anticorps dans les sérums. La surface peut être calculée à partir d'une courbe standard effectuée par dilutions successives d'un sérum de référence.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Les vaccins contre la grippe équine sont constitués de virus entier inactivés ou de leurs sous-unités, avec ou sans adjuvant. Un vaccin vivant atténué et un vaccin recombinant canaripox-grippe équine sont depuis récemment disponibles dans le commerce pour certains pays. Les exigences pour ces vaccins pourront différer sur certains points des exigences suivantes qui concernent les vaccins inactivés.

L'immunité induite par les vaccins inactivés administrés par voie intramusculaire repose sur la stimulation d'anticorps circulants dirigés contre l'HA, qui neutralisent le virus ; il a été montré que certains vaccins stimulent l'apparition d'anticorps dans les sécrétions de l'appareil respiratoire. Il est donc indispensable que l'intégrité et la conformation spatiale de l'HA soient conservées pendant les procédures d'inactivation afin que le vaccin stimule les anticorps neutralisants appropriés. Des tests permettent de vérifier cela, notamment l'hémolyse radiale qui mesure l'HA immunologiquement active et capable de réagir avec les anticorps spécifiques anti-HA. Le pouvoir immunogène du vaccin peut être confirmé en mesurant la quantité d'anticorps anti-HA stimulés chez des modèles animaux ou l'espèce cible.

Bien que les vaccins utilisant le canaripox comme vecteur d'expression, eux aussi administrés par voie intramusculaire, puissent stimuler les lymphocytes T cytotoxiques grâce à leur capacité de présenter les antigènes par des processus endogènes, ils ne comprennent que le gène de l'HA qui n'est pas considérée comme une cible de ces cellules. Leur action repose donc sur la stimulation des anticorps anti-HA. L'efficacité du vaccin recombinant (virus canaripox porteur des gènes de l'HA du virus de la grippe équine) est estimée par la mesure du titre infectieux du virus canaripox, et son pouvoir immunogène est estimé par la mesure des anticorps induits dans l'espèce cible.

Il existe une bonne corrélation entre la quantité des anticorps (induits par les vaccins inactivés, les sous-unités ou le vaccin recombinant canaripox) mesurés par hémolyse radiale et la protection vis-à-vis de l'infection dans un modèle d'épreuve (20). En revanche, un mutant « froid » utilisé comme vaccin à virus vivant atténué se multiplie dans le tractus respiratoire supérieur et ne stimule pas la production de titres élevés en anticorps circulants anti-HA, tout en procurant néanmoins une protection dans une épreuve infectieuse. Il est vraisemblable que l'immunité soit plus due aux réponses cellulaires et muqueuses qu'aux anticorps circulants. Comme pour le vaccin recombinant, les contrôles en cours de fabrication reposent sur la mesure du titre infectieux.

Les instructions pour la production de vaccins vétérinaires figurent au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices indiquées ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont générales et peuvent être complétées par des demandes au plan national ou régional.

1. Gestion des sémences virales

a) Caractéristiques de la sémence virale

Un programme de surveillance continue sous l'égide des Laboratoires de référence de l'OIE et de l'OMS et coordonné par le Laboratoire de référence de l'OIE (Newmarket) (21) a pour but d'apporter des informations sur les souches vaccinales appropriées. Les recommandations concernant les souches vaccinales fournies par le Groupe d'Expert de Surveillance sont publiées annuellement dans le *Bulletin* de l'OIE.

H7N7 : beaucoup de vaccins contiennent toujours la souche H7N7. Cependant le groupe d'Experts de Surveillance a recommandé de supprimer le composant H7N7 puisque peu d'infections par ce sous-type ont été signalées depuis 20 ans.

H3N8 : des variants du sous-type H3N8 peuvent circuler de façon concomitante (5). Il est important d'inclure une ou des souches significatives pour la région, comme cela est recommandé par le Groupe d'experts de l'OIE pour la Surveillance et est publié dans le *Bulletin* de l'OIE.

b) Méthode de culture

Les souches de virus peuvent être obtenues auprès des Laboratoires de référence de l'OIE (se reporter à la liste donnée dans la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). L'origine et le nombre de passages des virus sélectionnés comme souches vaccinales doivent être décrits. Les souches sont multipliées par inoculation intra-allantoïdienne à l'œuf de poule embryonnés de 10 jours ou en cultures cellulaires telles que les cellules MDCK. Toutes les manipulations doivent être effectuées séparément pour chaque souche. La croissance virale est contrôlée par des épreuves HA. Le virus multiplié est identifié par des épreuves sérologiques telles que les épreuves d'IH ou SRH ou par PCR avec des amorces spécifiques. Quand le virus est multiplié en culture cellulaire, il est nécessaire de préciser le pouvoir antigénique à l'aide d'anticorps de furet ou d'anticorps monoclonaux pour s'assurer que des variants n'ont pas été sélectionnés au cours des passages préalables à la préparation de la sémence virale primaire et de travail. La sémence virale primaire et de travail sont réparties en aliquots et conservées au congélateur à -20°C ou à -70°C après avoir été contrôlées quant à la présence d'agents étrangers. Un registre des conditions de conservation doit être établi.

La sémence primaire de chaque souche vaccinale choisie doit être préparée en une seule fois afin de s'assurer de l'homogénéité de sa composition. Elles sont complètement caractérisées et contrôlées quant à la présence d'agents étrangers. Les antisérums ou les anticorps monoclonaux utilisés dans les épreuves d'IH afin de caractériser les souches vaccinales peuvent être obtenus auprès des Laboratoires de référence de l'OIE et de l'OMS.

Les lots de sémence de travail proviennent d'un lot de sémence primaire et doivent être de composition homogène, exempte d'agents étrangers et parfaitement caractérisés. Des aliquots de la sémence de travail sont utilisés pour la production du vaccin.

Les lots de sémence primaire et de travail doivent être préparés dans des œufs exempts d'agents pathogènes spécifiques ou, au moins, dans des œufs provenant d'un troupeau en bonne santé.

Si on utilise des cellules MDCK pour multiplier le virus, les lignées cellulaires primaires doivent être établies, conservées en azote liquide et contrôlées pour l'absence d'agents étrangers selon les instructions de l'Autorité Nationale de Contrôle.

L'examen des sémences primaires quant à la présence d'agents étrangers tels que les mycoplasmes et autres virus équins doit être réalisé par des méthodes appropriées y compris l'inoculation aux cultures cellulaires et la recherche d'ECP ou l'utilisation d'anticorps fluorescents susceptibles de détecter des antigènes.

Il faut exclure de façon spécifique la présence d'autre virus équins communément répandus tels que les virus de l'herpès 1, 2 et 4, les picornavirus équins, l'artérite virale et les adénovirus équins.

L'absence de bactérie doit être confirmée par les tests de stérilité usuels et par des tests de toxicité sur des animaux de laboratoire.

c) Validation de la sémence candidate comme sémence vaccinale

Pour chaque souche virale un lot d'ensemencement prototype doit être préparé afin de s'assurer qu'il convient comme souche vaccinale, c.à.d. que sa pureté et son innocuité sont confirmées par les techniques

usuelles. La capacité des lots de virus à se multiplier intensément et à produire une quantité d'antigène suffisante pour induire une réponse satisfaisante d'anticorps doit être confirmée.

De plus, le virus du vaccin provenant d'une culture sur cellules MDCK devra être totalement identifié afin d'être certain qu'aucun variant antigénique n'est apparu durant la phase de culture, de telle manière que le virus utilisé dans le vaccin n'aurait plus de rapport avec l'isolat initial.

2. Méthode de fabrication

La production est basée sur un système de lots d'ensemencement validé selon les caractéristiques de la souche vaccinale. Quand des œufs sont utilisés, chaque souche de virus est inoculée séparément dans la cavité allantoïdienne d'œufs de poule embryonnés de 9 à 11 jours provenant d'un troupeau en bonne santé. Les œufs sont incubés à température convenable pendant 2 à 3 jours puis les liquides allantoïdiens sont collectés. Une alternative est d'inoculer séparément chaque souche sur des cultures de cellules MDCK. La suspension virale correspondant à chaque souche est collectée séparément et inactivée. Si nécessaire, elle peut être purifiée. Des adjuvants et des substances antimicrobiennes adaptées peuvent être rajoutés.

Les mélanges viraux monovalents doivent être inactivés aussitôt que possible par une méthode approuvée par l'Autorité Nationale de Contrôle. Si le formol (formaldéhyde 37 %) ou la bêta-propiolactone (2-oxetanone) sont utilisées la concentration par volume ne doit pas dépasser 0,2 %. De façon idéale, les mélanges doivent être conservés à 4 °C et doivent être inactivés dans les 5 jours suivant récolte. L'inactivation du vaccin doit être prouvée. Une méthode convenable consiste à inoculer 0,2 ml du mélange monovalent non dilué et des dilutions 1/10 et 1/100 d'un mélange monovalent à plusieurs lots d'œufs fertiles par voie intra-allantoïdienne (10 œufs par lot) et à les incubés à 33-37 °C pendant 3 jours. 8 œufs sur 10 au moins doivent survivre à chaque dilution. Un volume de 0,5 ml de liquide allantoïdien est récolté à partir de chaque œuf vivant. Les liquides de chaque lot sont mélangés et 0,2 ml de chacun de ces mélanges inoculés purs à un autre lot de 10 œufs embryonnés. Aucune activité hémagglutinante ne doit être détectée dans aucun de ces nouveaux lots d'œufs. Dans certains pays l'exigence de survie de 80 % des œufs ne peut être satisfaite, dans ce cas l'Autorité Nationale de Contrôle édicte d'autres exigences. Avant inactivation, des échantillons sont recueillis pour des tests de stérilité bactérienne et fongique.

Le matériel viral monovalent peut être concentré et purifié par centrifugation à haute vitesse ou d'autres méthodes convenables approuvées par l'Autorité Nationale de Contrôle avant ou après inactivation. Il est important de concentrer et purifier le virus dans des conditions optimum c.à.d. à une température préservant ses capacités antigéniques.

Il doit être prouvé que le mélange viral monovalent ne contient pas de virus vivant de la grippe à l'aide de tests effectués sur œufs embryonnés suivant une méthode approuvée par l'Autorité Nationale de Contrôle. Il est aussi possible de vérifier que l'inactivation est satisfaisante par inoculation sur des cultures de cellules MDCK.

3. Contrôles en cours de fabrication

Des contrôles adaptés en cours de fabrication doivent être mis en œuvre avant et après inactivation ainsi qu'avant et après concentration et purification.

Les contrôles en cours de fabrication incluent : (a) l'identité des souches de virus (à l'aide de l'épreuve d'IH) ; (b) la stérilité ; (c) le titre viral ; (d) la quantité d'hémagglutinine présente (mesurée en unités hémagglutinantes de GR de poule, en CCA [*Chick Cell Agglutination*, agglutination des cellules de poule] ; et (e) l'activité immunohémagglutinante (testée par hémolyse radiale ou une autre méthode immunochimique convenable).

• Hémolyse radiale

L'hémolyse radiale est une méthode fiable pour mesurer l'activité immunologique HA en terme de µg d'HA et est utilisée en routine pour la mesure de l'activité des vaccins antigrippaux humains (32).

L'activité des vaccins inactivés antigrippe équine dépend de la concentration en hémagglutinine immunologiquement active (22, 30, 31).

Établir la quantité d'antigène contenue dans le vaccin par CCA peut induire en erreur car la sensibilité de cet essai reflète la capacité des souches de virus à agglutiner les GRP. La fragmentation des virus peut amener une augmentation de l'activité HA mesurée par CCA. Cette épreuve CCA ne donne pas une mesure des activités antigéniques de l'HA (l'HA peut conserver ses aptitudes à se fixer aux GR tout en perdant ses capacités à stimuler la production d'anticorps).

La fabrication de certains vaccins antigrippe équine est inhabituelle du fait que ces produits peuvent contenir plus qu'un variant du sous-type H3N8. Dans ce cas, il n'est pas possible de juger de l'activité H3N8 de différents composants à partir de épreuves sérologiques réalisées sur des sérums recueillis sur des chevaux ou des petits animaux vaccinés avec le produit final à cause des réactions croisées entre deux isolats du même sous-type. De ce fait, il est important d'utiliser une méthode fiable telle que la SRD pour mesurer séparément et individuellement l'activité des composants avant et après inactivation et avant de les mélanger à l'adjuvant.

Dans l'hémolyse radiale, les préparations de virus sont comparées à une préparation calibrée de référence contenant une quantité connue d'HA. Les antigènes diffusent à travers un gel contenant un antisérum spécifique vis-à-vis d'une HA particulière. La distance de diffusion de l'antigène avant précipitation par un anticorps incorporé dans le gel est directement corrélée à la concentration de l'hémagglutinine dans la préparation d'antigène (19).

Des réactifs de référence normalisés pour l'épreuve SRD peuvent être obtenus auprès du Laboratoire de référence international pour les réactifs biologique de l'OMS². Les réactifs pour le virus A/eq/Prague/56 (H7N7) et les virus A/eq/Miami/63, A/eq/Kentucky/81, A/eq/Newmarket/1/63 (lignée américaine), et A/eq/Newmarket/2/93 (lignée européenne) sont couramment disponibles.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et de contrôle de l'absence de contamination des matériaux biologiques peuvent être consultés au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

- i) Inoculer individuellement, par voie intramusculaire et en deux endroits différents, une dose du vaccin spécifiée par le fabricant, à au moins 3 chevaux. Ces inoculations sont répétées 2 à 4 semaines après ; les animaux sont mis sous observation pendant 10 jours après la seconde série d'injections. Aucune réaction locale ou générale ne doit être observée par la suite.
- ii) Si le vaccin est utilisé sur des juments, son innocuité doit être démontrée en administrant à 2 juments gestantes au moins, 2 doses de vaccin aux intervalles prescrits, au cours du trimestre pendant lequel il est recommandé de vacciner.

c) Activité

Après avoir mélangé les antigènes viraux et les adjuvants, l'activité d'aliqots doit être vérifiée *in vivo* sur des chevaux et des cobayes ou par toute autre épreuve immunochimique alternative. Les adjuvants entraînent des interférences dans les épreuves quantitatives *in vitro* telles que le CCA ou la SRD bien que la SRD puisse être utilisée sur le produit final en tant qu'essai quantitatif pour démontrer la présence d'antigène correspondant à chaque souche vaccinale. Pour les tests des lots suivants seuls des tests sur cobaye ou des épreuves immunochimiques alternatives sont mises en œuvre du moment qu'elles ont été approuvées par l'Autorité Nationale de Contrôle.

i) Réponse sérologique sur chevaux

Pour qu'un test d'activité *in vivo* soit valide, il est nécessaire de sélectionner des chevaux séronégatifs avant vaccination. De jeunes chevaux ou des poneys (d'au moins 6 mois) doivent être contrôlés pour la présence d'anticorps en utilisant les virus H7N7 et H3N8, notamment les souches récemment isolées dans la région d'où proviennent les animaux. Si on utilise l'épreuve d'IH en contrôle les virus H3N8 doivent être traités au Tween 80/éther pour augmenter au maximum la sensibilité de l'épreuve. On peut aussi utiliser la SRH pour vérifier la séronégativité des animaux.

L'efficacité d'un vaccin chez le cheval est testée en injectant individuellement un volume correspondant à une dose vaccinale par la voie recommandée à 5 chevaux sensibles séronégatifs. Une seconde dose est administrée à chaque cheval à la fin de la période recommandée entre la première et la seconde injection tel qu'il est spécifié dans la notice.

Trois échantillons de sang sont prélevés sur chaque animal, un premier lors de la première vaccination, un second une semaine après la première vaccination et le troisième 2 semaines après la deuxième vaccination.

2 National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN63QG, Royaume-Uni.

L'épreuve sérologique utilisée pour mesurer la réponse en anticorps vis-à-vis des virus contenus dans le vaccin doit être normalisée par un test d'activité *in vivo* validé. C'est pourquoi l'épreuve SRH est préférable (voir paragraphe B.2.b). Des sérums de référence normalisés pour le contrôle qualité des vaccins anti-grippe équine peuvent être obtenus auprès de la Pharmacopée Européenne³. Ces sérums doivent être testés en parallèle avec le sérum test afin de s'assurer que le test est valide au regard de la sensibilité ; les valeurs obtenues ne doivent pas varier au-delà de 20 % par rapport aux valeurs SRH qui ont été attribuées à l'issue d'une étude collective internationale (18). Du fait du manque de répétabilité et de reproductibilité des épreuves d'IH, il ne faut pas les pratiquer sur ces sérums.

La teneur en anticorps mesurée par SRH ne doit pas être inférieure à 150 mm². Cette valeur est supérieure à celle exigée par la monographie de la Pharmacopée Européenne pour les vaccins inactivés anti-grippe équine (85 mm²) car cette dernière n'est pas considérée comme assurant une protection. Si la valeur trouvée chez un des chevaux après la première injection indique une réponse anamnétique ce résultat n'est pas pris en compte. Une épreuve supplémentaire est effectuée comme ci-dessus en remplaçant le cheval ayant eu une réponse anamnétique par un autre animal.

Si on utilise l'épreuve d'IH, le titre en anticorps de chaque sérum prélevé après la seconde vaccination ne doit pas être inférieur à 1/64 (calculé à partir du sérum d'origine et prenant en compte la dilution préalable au 1/8). Une méthode alternative consiste à comparer le taux d'anticorps induit par le vaccin en cours de contrôle avec un vaccin de référence testé en parallèle et dont on a démontré les capacités de protection contre une épreuve virulente.

ii) *Épreuves sur chevaux*

Il peut être nécessaire dans certains cas de mettre en œuvre des épreuves sur chevaux afin de démontrer l'activité des vaccins en particulier, si on veut vérifier la capacité de ces vaccins à protéger contre des virus antigéniquement différents. Les épreuves doivent être pratiquées en exposant 6 chevaux ou poneys à un aérosol de virus grippal virulent au moins 2 semaines après injection de la seconde dose de vaccin. La comparaison des signes cliniques, de l'excrétion virale et de la réponse sérologique est effectuée avec un groupe d'au moins 4 chevaux témoins non vaccinés testés au même moment (19, 20). Le moment choisi pour tester les chevaux doit reposer sur la durée d'immunisation annoncée sur la notice d'accompagnement.

Si des tests d'activité sur cheval ont été menés avec des résultats satisfaisants sur un lot représentatif du vaccin il est possible de ne pas les pratiquer en contrôle de routine sur des lots de vaccin préparés à partir du même système de lot-séquence sous réserve de l'accord de l'Autorité Nationale de Contrôle.

iii) *Réponse sérologique de cobayes*

Inoculer au moins 5 cobayes dépourvus d'anticorps spécifiques avec une dose par animal. Recueillir de échantillons sanguins 21 jours après et tester les sérums par SRH ou IH (voir paragraphes B.2.a et B.2.b). Réaliser les épreuves sur chaque sérum en utilisant le ou les antigène(s) correspondant à la ou aux souche(s) utilisée(s) pour produire le vaccin. Le titre en anticorps pour chaque sérum et pour chaque épreuve ne doit pas être inférieur à celui induit par un vaccin de référence dont la capacité à protéger des chevaux a été démontrée.

d) Durée de l'immunité

Lorsque des durées d'immunité sont revendiquées sur la notice d'accompagnement celles-ci doivent reposer sur des données indiquant la persistance des niveaux d'anticorps protecteurs chez des chevaux vaccinés selon le protocole recommandé. Les niveaux d'anticorps considérés comme protecteurs doivent être validés par des tests d'épreuve virulente (voir paragraphe C.4.c.ii) ou par comparaison avec des données publiées.

e) Stabilité

Les vaccins doivent être conservés à 5 °C (± 3 °C) et protégés de la lumière. La durée de conservation indiquée sur la notice d'accompagnement doit avoir été démontrée par des tests d'activité sur cobaye à partir d'aliots arrivant en péremption (Voir Section C.4.c.iii).

f) Agents de conservation

Normalement, il n'est pas ajouté d'agents de conservation.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Le contenu de chaque flacon ouvert doit être utilisé dans l'heure qui suit. Les précautions d'asepsie doivent être observées à chaque administration de vaccin et on ne doit vacciner que des chevaux en bonne santé. À

3 Sérum anti A/eq/Newmarket/1/77 (N° catalogue A0850010), Aeq/Newmarket/1/93 (E0850021) et A/eq/Newmarket/2/93 (E0850022).

l'occasion, il est possible d'observer des réactions locales générales transitoires et il est recommandé de mettre les animaux au repos pendant 24 à 48 h après la vaccination.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Les tests sont effectués comme décrit au paragraphe C.4.b.i. Lorsque l'innocuité a été démontrée sur un lot prototype il est possible de ne pas effectuer de tests d'innocuité en routine sur juments gestantes à partir des lots de produit final.

b) Activité

Voir paragraphe C.4.c.iii. Au minimum, réaliser une épreuve sérologique sur cobaye pour chaque lot du produit final.

c) Disponibilité de souches vaccinales épidémiologiquement adaptées

Pour permettre aux fabricants de répondre rapidement aux recommandations du Groupe d'Experts de Surveillance pour mettre à jour les souches vaccinales, le Comité du Médicament Vétérinaire de l'Agence Européenne du Médicament Vétérinaire a mis au point un système d'autorisation rapide applicable en cas de mise à jour des souches vaccinales (9).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALEXANDER D.J. & BROWN I.H. (2000). Recent zoonoses caused by influenza A viruses. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **19**, 197–225.
2. CHAMBERS T.M., SHORTRIDGE K.F., LI P.H., POWELL D.G. & WATKINS K.L. (1994). Rapid diagnosis of equine influenza by the Directigen FLU-A enzyme immunoassay. *Vet. Rec.*, **135**, 275–279.
3. COOK R.F., SINCLAIR R. & MUMFORD J.A. (1988). Detection of influenza nucleoprotein antigen in nasal secretions from horses infected with A/equine influenza (H3N8) viruses. *J. Virol. Methods*, **20**, 1–12.
4. CRAWFORD P.C., DUBOVI E.J., CASTLEMAN W.L., STEPHENSON I., GIBBS E.P., CHEN L., SMITH C., HILL R.C., FERRO P., POMPEY J., BRIGHT R.A., MEDINA M.J., JOHNSON C.M., OLSEN C.W., COX N.J., KLIMOV A.I., KATZ J.M. & DONIS R.O. (2005). Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science*, **310**, 482–485.
5. DALY J.M., LAI A.C.K., BINNS M.M., CHAMBERS T.M., BARRANDEGUY M. & MUMFORD J.A. (1996). Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. *J. Gen. Virol.*, **77**, 661–671.
6. DALY J.M., NEWTON J.R. & MUMFORD J.A. (2004). Current perspectives on control of equine influenza. *Vet. Res.*, **35**, 411–423.
7. DALY J.M., WHITWELL K.E., MILLER J., DOWD G., CARDWELL J.M. & SMITH K.C. (2006). Investigation of equine influenza cases exhibiting neurological disease: coincidence or association? *J. Comp. Pathol.*, **134** (2–3), 231–135. [PMID: 16527298]
8. DONOFRIO J.C., COONROD J.D. & CHAMBERS T.M. (1994). Diagnosis of equine influenza by the polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 39–43.
9. EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMA), COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS (CVMP) (1998). Note for Guidance: Harmonisation of Requirements for Equine Influenza Vaccines Specific Requirements for Substitution or Addition of a Strain or Strains. Document EMA/CVMP/112/98-FINAL, EMA, London, UK.
10. GERBER H. (1970). Clinical features, sequelae and epidemiology of equine influenza. In: Equine Infectious Diseases II, Bryans J.T. & Gerber H., eds. S. Karger, Basel, Switzerland, 63–80.
11. ILOBI C.P., HENFREY R., ROBERTSON J.S., MUMFORD J.A., ERASMUS B.J. & WOOD J.M. (1994). Antigenic and molecular characterisation of host-cell mediated variants of equine H3N8 influenza viruses. *J. Gen. Virol.*, **75**, 669–673.

12. JOHN T.J. & FULGINITI V.A. (1966). Parainfluenza 2 virus: increase in haemagglutinin titre on treatment with Tween-80 and ether. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **121**, 109–111.
13. LAI A.C., CHAMBERS T.M., HOLLAND R.E. JR, MORLEY P.S., HAINES D.M., TOWNSEND H.G. & BARRANDEGUY M. (2001). Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere. *Arch. Virol.*, **149**, 1063–1074.
14. LIVESAY G.J., O'NEILL T., HANNANT D., YADAV M.P. & MUMFORD J.A. (1993). The outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 1989; diagnostic use of an antigen capture ELISA. *Vet. Rec.*, **133**, 515–519.
15. MADIC J., MARTINOVIC S., NAGLIC T., HAJSIG D. & CVETNIC S. (1996). Serological evidence for the presence of A/equine-1 influenza virus in unvaccinated horses in Croatia. *Vet. Rec.*, **138**, 68.
16. MORLEY P.S., BOGDAN J.R., TOWNSEND H.G.G. & HAINES D.M. (1995). The effect of changing single radial haemolysis assay method when quantifying influenza A antibodies in serum. *Vet. Microbiol.*, **44**, 101–110.
17. MUMFORD J.A. (1992). Progress in the control of equine influenza. In: Equine Infectious Disease VI: Proceedings of the Sixth International Conference, Plowright W., Rosedale P.D. & Wade J.F., eds. Newmarket, R & W Publications, UK, 207–217.
18. MUMFORD J. (2000). Collaborative study for the establishment of three European Pharmacopoeia biological reference preparations for equine influenza horse antiserum. *PHARMEUROPA Special Issue, Bio 2000-1*, 5–21.
19. MUMFORD J.A., HANNANT D. & JESSETT D.M. (1990). Experimental infection of ponies with equine influenza (H3N8) viruses by intranasal inoculation or exposure to aerosols. *Equine Vet. J.*, **22**, 93–98.
20. MUMFORD J.A. & WOOD J. (1993). Establishing an acceptability threshold for equine influenza vaccines. *Dev. Biol. Stand.*, **79**, 137–146.
21. MUMFORD J.A. & WOOD J. (1993). WHO/OIE Meeting: Consultation on Newly Emerging Strains of Equine Influenza. *Vaccine*, **11**, 1172–1175.
22. MUMFORD J., WOOD J.M., SCOTT A.M., FOLKERS C. & SCHILD G.C. (1983). Studies with inactivated equine influenza vaccine 2. Protection against experimental infection with influenza virus A/equine/Newmarket/79 (H3N8). *J. Hyg. (Camb.)*, **90**, 385–395.
23. OXBURGH L. & HAGSTROM A.A. (1999). A PCR based method for the identification of equine influenza virus from clinical samples. *Vet. Microbiol.*, **67**, 161–174.
24. OXBURGH L. & KLINGBORN B. (1999). Cocirculation of two distinct lineages of equine influenza virus subtype H3N8. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3005–3009.
25. PLATEAU E. & CRUCIERE C. (1983). Study on radial haemolysis method for the detection of anti influenza equiantibodies in equine sera: reliability and expression of the results. *Zentralbl. Veterinarmed [B]*, **30**, 512–520.
26. QUINLIVAN M., DEMPSEY E., RYAN F., ARKINS S. & CULLINANE A. (2005). Real-time reverse transcription PCR for detection and quantitative analysis of equine influenza virus. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5055–5057.
27. SCHILD G.C., PEREIRA, M.S. & CHAKRAVERTY P. (1975). Single radial haemolysis: a new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin. *Bull. WHO*, **52**, 43–50.
28. UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (1982). Concepts and Procedures for Laboratory-Based Influenza Surveillance. Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA, 81–835.
29. WEBSTER R.G. (1993). Are equine 1 influenza viruses still present in horses? *Equine Vet. J.*, **25**, 537–538.
30. VAN MAANEN C. & CULLINANE A. (2002) Equine influenza virus infections: an update. *Vet. Q*, **24** (2), 79–94.
31. WOOD J.M., MUMFORD J., FOLKERS C., SCOTT A.M. & SCHILD G.C. (1983). Studies with inactivated equine influenza vaccine 1. Serological responses of ponies to graded doses of vaccine. *J. Hyg. (Camb.)*, **90**, 371–384.

32. WOOD J.M., SCHILD G.C., FOLKERS C., MUMFORD J. & NEWMAN R.W. (1983). The standardisation of inactivated equine influenza vaccines by single-radial immunodiffusion. *J. Biol. Stand.*, **11**, 133–136.
33. WOOD J.M., SCHILD G.C., NEWMAN R.W. & SEAGROATT V. (1977). An improved single-radial-immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen. Application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines. *J. Biol. Stand.*, **5**, 237–247.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la grippe équine (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).

PIROPLASMOSES ÉQUINES

RÉSUMÉ

La piroplasmose équine est une protozoose du cheval, de la mule, de l'âne et du zèbre, transmise par des tiques. Les agents étiologiques sont des parasites sanguins appelés Theileria equi et Babesia caballi. Theileria equi était désigné antérieurement comme Babesia equi. Les animaux infectés peuvent rester porteurs de ces parasites pour de longues périodes et être sources d'infection pour les tiques qui agissent en tant que vecteurs. Les parasites sont observés en position intra-érythrocytaire chez l'animal infecté.

L'introduction d'animaux porteurs dans des zones où les tiques sont présentes peut conduire à conférer à la maladie un aspect épizootique.

Identification de l'agent pathogène : *les chevaux infectés peuvent être identifiés en mettant en évidence, pendant la phase aiguë de la maladie, les parasites par étalements colorés de sang ou calques d'organes. Les techniques de coloration de type Romanovsky ou Giemsa donnent les meilleurs résultats. Chez l'animal porteur, de faibles parasitémiées rendent la détection parasitaire très difficile, particulièrement dans le cas d'infections à B. caballi, bien qu'elle puisse être révélée par la technique de la goutte épaisse.*

Les mérozoïtes bigeminés, contigus par leurs extrémités postérieures, constituent l'élément diagnostique de l'infection à B. caballi. Les parasites dans les érythrocytes mesurent $2 \times 5 \mu\text{m}$. Les mérozoïtes de T. equi sont d'une longueur inférieure à $2\text{-}3 \mu\text{m}$, et sont piriformes, ronds ou ovoïdes. Une caractéristique de T. equi est la disposition des 4 mérozoïtes piriformes en tétrade ou « croix de Malte ».

Des techniques moléculaires pour la détection de T. equi et de B. caballi, basées sur des épreuves d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) spécifiques qui ciblent le gène de l'ARN 18S ont été développées et se généralisent. Ces épreuves se sont révélées hautement spécifiques et sensibles et leur rôle dans le diagnostic des infections ne peut que s'accroître.

Épreuves sérologiques : *les infections chez les animaux porteurs sont mises en évidence par des examens sérologiques de détection d'anticorps.*

Habituellement, l'immunofluorescence indirecte (IFI) et la méthode immuno-enzymatique de compétition (c-ELISA) sont les premiers tests utilisés pour autoriser l'importation de chevaux. La fixation du complément (FC), test principal pendant des années, a été remplacée par l'IFI et le c-ELISA. En effet, ces épreuves se sont révélées plus efficaces dans le dépistage des animaux anciennement infectés et ceux qui ont été traités avec des antiparasitaires ; ces animaux peuvent donner une réponse négative en FC en étant toujours infectés. L'IFI et le c-ELISA sont très spécifiques vis-à-vis de chacune des deux espèces de piroplasmes impliquées. Des ELISA indirects peuvent aussi être utilisés pour rechercher les anticorps dirigés contre chacune des espèces chez les chevaux infectés, bien que des réactions croisées entre T. equi et B. caballi se produisent. L'utilisation de protéines recombinantes de mérozoïtes de T. equi et B. caballi dans les épreuves de diagnostic semble promettre une détermination précise des infections à piroplasmes.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *il n'existe ni vaccins ni produits biologiques disponibles.*

A. INTRODUCTION

La piroplasmose des équidés est une protozoose du cheval, de la mule, de l'âne et du zèbre, transmise par des tiques. Les agents étiologiques de la piroplasmose équine sont *Theileria equi* et *Babesia caballi*. Douze espèces de tiques ixodidés des genres *Dermacentor*, *Rhipicephalus* et *Hyalomma* ont été identifiées comme des vecteurs à transmission transstadiale de *B. caballi* et *T. equi*, alors que 8 de ces espèces sont également capables de transmettre *B. caballi* de façon transovarienne (7, 36, 44, 45). Les animaux infectés peuvent rester porteurs de ces parasites sur de longues périodes et jouer le rôle de sources d'infection pour les tiques vectrices.

Ces parasites sont présents en Europe du sud, en Asie, dans les pays des États indépendants du Commonwealth, en Afrique, à Cuba, en Amérique centrale et du sud, et dans certaines zones du sud des États-Unis. *Theileria equi* a également été rapportée en Australie (mais apparemment elle ne s'est jamais établie dans cette région) et est désormais considérée comme ayant une plus large répartition que *B. caballi*.

Au cours du cycle évolutif de *Babesia*, les sporozoïtes commencent par pénétrer les globules rouges au sein desquels ils se transforment en trophozoïtes (10, 37). Dans les globules rouges, les trophozoïtes grandissent et se divisent en deux mérozoïtes arrondis, ovales ou en forme de poire. Les mérozoïtes matures sont alors capables d'infecter de nouveaux globules et le processus peut ainsi se répéter.

Les mérozoïtes intra-érythrocytaires de *Babesia caballi* sont piriformes, de 2 à 5 µm de longueur et de 1,3 à 3 µm de diamètre (27). Les mérozoïtes bigeminés sont jointifs par leur extrémité postérieure et sont considérés comme preuves diagnostiques d'une infection à *B. caballi* (32).

Pour *Theileria equi*, les mérozoïtes de cet organisme sont assez petits, moins de 2 à 3 µm de longueur (27) et sont piriformes, circulaires ou ovoïdes. La disposition de 4 mérozoïtes piriformes (mesurant environ 2 µm) en tétrade ou « croix de Malte » est un élément caractéristique de *T. equi* (14).

Lors d'une infection à *T. equi*, il a été démontré que les sporozoïtes inoculés à un cheval lors d'une morsure de tique envahissent les lymphocytes (41). Les sporozoïtes continuent leur développement dans le cytoplasme de ces lymphocytes et éventuellement forment des schizontes *Theileria*-like. Les mérozoïtes libérés de ces schizontes pénètrent des globules rouges. La position taxinomique de *T. equi* a été controversée et ce n'est que depuis peu qu'elle a été redéfinie comme une *Theileria* (33). Des arguments supplémentaires en faveur de la relation avec les theiléria viennent également de l'homologie établie entre des protéines de surface de 30 et 34 kDa de *T. equi* et des protéines similaires de diverses theiléria (22, 24). Néanmoins, la position phylogénétique de *T. equi* sur la base de la sous-unité ribosomale des gènes ARN est variable, et apparaît surtout comme un clade proche des Theilériidés (6, 35), ce qui suggère que *T. equi* pourrait être un ancêtre des Theilériidés (6) ou aussi un groupe différent (3). Les signes cliniques de piroplasmose équine sont souvent non spécifiques et la maladie peut aisément être confondue avec d'autres.

La piroplasmose peut s'exprimer sous forme suraiguë, aiguë et chronique. Les formes aiguës sont les plus courantes et sont caractérisées par une fièvre excédant habituellement 40 °C, une anorexie et un abattement, une tachypnée et tachycardie, une congestion des muqueuses et des crottins plus petits et plus secs que d'habitude.

Les signes cliniques de la forme subaiguë sont similaires. En outre, les animaux maigrissent et la fièvre est parfois intermittente. Les muqueuses varient de rose pâle à rose ou de jaune pâle à jaune vif. Des pétéchies ou des ecchymoses peuvent également être observées. Le péristaltisme intestinal peut être diminué et les animaux peuvent présenter de légers signes de colique. Des œdèmes modérés à l'extrémité distale des membres peuvent également apparaître.

Les cas chroniques présentent habituellement des signes cliniques non spécifiques comme une inappétence modérée, des performances diminuées et une baisse de poids. À la palpation rectale, la rate est habituellement augmentée de volume.

De rares cas mortels ont été décrits dans la forme suraiguë chez les chevaux (28).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Les chevaux infectés peuvent être dépistés en mettant en évidence les parasites par coloration de frottis, prélevé de préférence dans les capillaires cutanés, ou de calques d'organes pendant la phase aiguë de la maladie. Les méthodes de coloration de type Romanovsky ou Giemsa donnent habituellement les meilleurs résultats (43). Cependant, même dans les formes cliniques aiguës de l'infection à *B. caballi*, la faible parasitémie rend difficile la

détection de parasites. Lorsque c'est le cas, les personnels expérimentés peuvent parfois détecter un faible parasitémie en utilisant la méthode de la goutte épaisse (30). Cette méthode consiste à déposer une petite goutte de sang (50 µl approximativement) sur une lame porte-objet. Cette goutte est séchée à l'air, fixée à 80 °C pendant 5 min, et colorée au Giemsa à 5 % pendant 20 à 30 min.

Une identification des espèces de parasites est parfois nécessaire puisque des infections mixtes à *T. equi* et *B. caballi* se produisent fréquemment.

Le diagnostic d'une piroplasmose équine chez un animal porteur par la détection de parasites dans le sang est non seulement difficile mais aussi imprécis ; les méthodes sérologiques sont donc préférées pour cette raison (cf. ci-dessous). Néanmoins, des faux négatifs ou faux positifs peuvent être enregistrés par des épreuves sérologiques (8, 9, 49). Dans de tels cas, le recours au sang total, bien qu'onéreux et encombrant, est une technique très utilisée pour établir la situation véritable. De grandes quantités de sang total (500 ml) sont transfusées à un cheval réceptif, de préférence splénectomisé. Cet animal est ensuite gardé sous observation étroite pour déceler les signes cliniques de la maladie. Le diagnostic est confirmé par la présence de parasites dans les globules rouges.

De façon complémentaire, une tique vectrice non infectée est nourrie sur un animal suspect et l'organisme peut ensuite être identifié chez la tique elle-même, ou par l'intermédiaire de la transmission de l'organisme par la tique vectrice à un autre animal réceptif.

Les résultats dans la mise au point de cultures *in vitro* de *T. equi* et *B. caballi* peuvent constituer une alternative aux méthodes décrites ci-dessus dans le but d'identifier les porteurs de parasites (15, 16, 53, 54). *Babesia caballi* a été mise en culture avec succès à partir du sang de deux chevaux testés négativement par la fixation du complément (16). De façon comparable, *T. equi* peut être mise en culture à partir de chevaux qui ne montrent aucune parasitémie patente au moment de la mise en œuvre des cultures (53, 54).

Des techniques moléculaires pour la détection de *T. equi* et *B. caballi* ont été décrites. Il s'agit d'épreuves d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) spécifiques d'espèce, qui ciblent le gène 18S de l'ARNr (4, 6, 40). Des techniques améliorées ont été développées dont : une épreuve de PCR nichée (38), une épreuve de PCR à température ambiante avec amplification en boucle (LAMP pour *Loop-Mediated Isothermal Amplification*) (1) pour laquelle une meilleure sensibilité a été rapportée, une épreuve d'hybridation inverse (également très sensible), et enfin une PCR multiplex pour la détection et l'identification simultanément des espèces de *Theileria* et de *Babesia* chez le cheval (2, 35).

2. Épreuves sérologiques

Il est extrêmement difficile de reconnaître les parasites chez un animal porteur par le moyen de l'examen microscopique d'étalements de sang. En outre, il n'y a pas de moyen pratique à grande échelle. Les épreuves sérologiques sont recommandées comme méthodes préférentielles de diagnostic, particulièrement chez le cheval destiné à l'importation dans des pays où la maladie n'existe pas, mais où le vecteur est présent.

Les sérums doivent être collectés et distribués dans les laboratoires de diagnostic selon leur compétence. Les chevaux à l'exportation soumis aux épreuves sérologiques et enregistrés comme indemnes doivent être gardés à l'abri des tiques pour prévenir toute infection accidentelle.

Un certain nombre de techniques sérologiques ont été utilisées dans le diagnostic des piroplasmoses comme la fixation du complément (FC), l'immunofluorescence indirecte (IFI) et la méthode immuno-enzymatique (ELISA). En outre, un test simple et rapide d'immunochromatographie pour le dépistage de *T. equi* a été décrit et pourrait se révéler un test pratique pour le criblage d'un grand nombre de sérums (17).

a) Immunofluorescence indirecte (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

L'IFI a été appliquée avec succès pour différencier les infections à *T. equi* et à *B. caballi* (29). La reconnaissance d'une forte réaction positive est assez simple, mais toute différence entre une réaction faiblement positive et une réaction négative nécessite une solide expérience pour l'interprétation. Une description détaillée du protocole IFI a été publiée (29, 34). Un exemple est décrit ci-dessous.

- **Production d'antigène**

Le sang est obtenu à partir de chevaux en parasitémie élevée, idéalement 2 à 5 %. Les animaux porteurs ne sont pas appropriés pour la production d'antigènes parce qu'ils ont déjà produit des anticorps. Le sang (environ 15 ml) est collecté dans 235 ml de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,2. Les globules rouges sont lavés 3 fois dans du PBS froid (1 000 g pendant 10 min à 4 °C). Le surnageant et la couche de globules blancs sont éliminés à chaque rinçage. Après le dernier rinçage, le culot de globules rouges est remis en suspension dans le volume initial dans du PBS avec de la fraction V

de sérum albumine bovine, c'est-à-dire que le volume du culot de globules rouges étant de 30 %, un tiers est constitué de globules rouges. Si le volume initial des globules rouges est de 15 ml, alors 5 ml de globules + 10 ml d'albumine bovine à 4 % dans du PBS constituent l'antigène. Après mélange, l'antigène est déposé dans des puits préparés sur une lame porte-objet en utilisant une seringue (34). Il est aussi possible de disperser doucement les cellules sur la lame pour qu'elles recouvrent toute la surface d'un film mince. Les lames sont séchées, emballées dans du papier filtre puis dans des sacs en plastique ou emballées dans du papier aluminium et conservées à -20°C pendant 1 an.

- **Protocole**

- Chaque échantillon de sérum est testé contre les antigènes de *B. caballi* et de *T. equi*.
- Avant usage, les lames d'antigène congelées sont retirées du congélateur à -20°C et incubées à 37°C pendant 10 min.
- Les frottis sont dégagés de leur enveloppe protectrice et fixés dans de l'acétone à -20°C pendant 1 min. Des lames commercialisées pré-fixées sont disponibles.
- Si les frottis sont préparés sur toute la surface de la lame, des carrés (de 14 à 21, c'est à dire 2 à 3 lignes de 7 carrés chacune) sont dessinés sur la lame avec du vernis à ongles ou en laissant sécher du milieu de montage (c'est-à-dire du Cytostéal).
- Les sérums positif, négatif et à tester sont dilués de 1/80 à 1/1280 dans du PBS. Les sérums témoins positif et négatif sont inclus dans chaque épreuve.
- Les sérums sont appliqués (10 μl chacun) aux dilutions appropriées dans les différents puits ou carrés dessinés sur la lame d'antigène, incubés à 37°C pendant 30 min, rincés plusieurs fois dans du PBS et une fois dans l'eau.
- Une immunoglobuline anti-cheval préparée sur lapin et conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine (conjugué disponible dans le commerce) est diluée dans le PBS et appliquée sur le frottis, incubée et rincée comme ci-dessus.
- Après le dernier rinçage, deux gouttes de solution contenant à parts égales de la glycérine et du PBS sont déposées sur les frottis et recouverts d'une lamelle.
- Le frottis est ensuite examiné au microscope à fluorescence. Le sérum dilué au 1/80 ou plus qui montre une forte fluorescence est considéré comme positif en comparaison avec les niveaux de fluorescence des témoins positif et négatif.

b) Méthode immuno-enzymatique (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Au cours des dernières années, des antigènes recombinants pour les ELISA ont été décrits. Les protéines recombinantes du mérozoïte de *T. equi* (EMA-1, EMA-2, Be82 et Be158) et de *B. caballi* (RAP-1, Bc48 et Bc134) ont été produites chez la bactérie *Escherichia coli* (12, 13, 18, 20, 21, 25, 46) ou dans des cellules d'insectes infectées par des baculovirus (47, 52). Les antigènes recombinants produits dans *E. coli* ou le baculovirus ont l'avantage évident d'éviter la production d'antigènes sur des chevaux infectés et ils suppriment les réactions croisées rencontrées auparavant lors de l'utilisation d'antigènes bruts. Ils fournissent aussi une source substantielle d'antigènes pour la distribution et la normalisation internationale.

Les ELISA indirects utilisant EMA-2 et Bc48 ont fait preuve d'une sensibilité et d'une spécificité élevées dans la détection des anticorps chez les chevaux infectés (18, 19, 47). Les résultats préliminaires de ces tests sont prometteurs et une validation complémentaire de ces tests est en cours.

Un ELISA de compétition (c-ELISA) utilisant la protéine EMA-1 et un anticorps monoclonal (AcM), dirigé contre un épitope de cette protéine de surface du mérozoïte, sont utilisés dans un c-ELISA pour *T. equi* (25). Ce c-ELISA surmonte le problème de la pureté antigénique puisque la spécificité d'un tel test dépend uniquement de la spécificité de l'épitope de *T. equi* reconnu par l'AcM. Une corrélation de 94 % est démontrée entre le c-ELISA et la FC pour la détection des anticorps contre *T. equi*. Les sérums donnant des résultats divergents sont évalués selon leur capacité à immunoprécipiter les produits marqués à la méthionine- S^{35} de la traduction de l'ARNm des mérozoïtes de *T. equi*. Les échantillons positifs en c-ELISA et négatifs en FC précipitent de multiples protéines de *T. equi*. Cependant, les résultats de l'immunoprécipitation d'échantillons de sérums négatifs en c-ELISA et positifs en FC ne sont pas concluants (26). Ce c-ELISA pour *T. equi* a été récemment validé au Maroc et en Israël avec une concordance respective de 91 % et 95,7 % avec l'IFI (39, 42). Un c-ELISA similaire a été développé en utilisant une protéine de roptrie de *B. caballi* (RAP-1) et un AcM réagissant avec un épitope peptidique d'un antigène de 60 kDa de *B. caballi* (21). Les résultats concernant 302 échantillons de sérums testés en c-ELISA et en FC montrent une concordance de 73 %. Sur les 72 échantillons FC négatifs et c-ELISA positifs, 48 (67 %) se révèlent positifs en IFI alors que 4 des 5 échantillons FC positifs et c-ELISA négatifs sont positifs en IFI (21).

Un protocole pour un c-ELISA en matière de piroplasmose équine a été décrit et testé pour des études supplémentaires de validation (23, 51). La spécificité apparente des c-ELISAs pour *T. equi* et *B. caballi* s'étend de 99,2 % à 99,5 % en testant 1 000 sérums provenant de chevaux présumés indemnes de piroplasmose. Un millier de chevaux d'origine étrangère et au statut infectieux inconnu ont été testés en c-ELISA et FC avec une plus grande sensibilité apparente pour le c-ELISA. Les résultats révèlent que le c-ELISA détecte 1,1 % (*T. equi*) et 1,3 % (*B. caballi*) d'animaux séropositifs de plus que la FC ; des résultats positifs complémentaires sont obtenus avec l'IFI. Au cours d'une étude similaire, 645 chevaux d'origine étrangère ont été testés en vue d'importation avec des sérums pré-chauffés (58 °C pendant 30 min) : le c-ELISA a détecté plus d'animaux positifs que la FC (3,6 % pour *T. equi* et 2,1 % pour *B. caballi*). Les deux c-ELISAs sont très reproductibles de puits à puits, de plaque à plaque et en fonction du temps, avec des variances respectives de $\pm 1,2$ % et 1,6 % pour *B. equi* et *B. caballi*.

Le protocole pour le c-ELISA est donné ci-dessous.

Une description détaillée de la production de l'antigène et du protocole a été publiée par les *National Veterinary Services Laboratories* du Département de l'Agriculture des États-Unis d'Amérique (USDA) (51). Un kit de diagnostic est maintenant disponible dans le commerce qui est basée sur les mêmes antigènes et les mêmes anticorps monoclonaux.

- **Solutions**

Tampon de dilution des antigènes : préparer le volume de tampon en suivant les concentrations suivantes par litre : 2,93 g de bicarbonate de soude ; 1,59 g de carbonate de soude ; eau distillée 1 litre ; ajuster à pH 9,6.

Solution de rinçage c-ELISA (diluant fortement salin) : préparer le volume de cette solution en utilisant les quantités suivantes d'ingrédients par litre : 29,5 g de chlorure de sodium ; 0,22 g de phosphate monosodique ; 1,19 g de phosphate disodique ; 2 ml de Tween 20 ; eau distillée 1 litre ; bien mélanger ; ajuster à pH 7,4. Stériliser par autoclave à 121 °C.

- **Production d'antigène**

Une culture d'*E. coli* modifiée est inoculée à une concentration de 1/10 000 dans un milieu de culture classique et non spécifique d'une bactérie en particulier (par ex. : le bouillon de Luria), additionné de carbenicilline (100 µg/ml) et d'isopropylthiogalactoside (IPTG, 1 mM). Les cultures sont mises en incubation dans un agitateur rotatif à 200 tr/min à 37 °C durant une nuit. Les cellules s'étant multipliées durant la nuit sont récoltées par centrifugation (5 000 g pendant 10 min), rincées dans un tampon à 50 mM Tris/HCl et 5 mM d'EDTA (acide éthylène-diamine-tétra-acétique), pH 8 et récoltées une nouvelle fois (l'antigène est disponible au *National Veterinary Services Laboratories*, PO Box 844, Ames, Iowa 50010, États-Unis d'Amérique).

Les cellules sont remises en suspension à 10 % du volume initial dans un tampon Tris/EDTA additionné de 1 mg/ml de lysozyme et incubé dans la glace pendant 20 min. Un solvant Nonidet P-40 (NP-40) est ajouté à la concentration de 1 % (v/v), mélangé et incubé dans de la glace pendant 10 min. Le matériel est soumis aux ultrasons 4 fois à 100 watts, 30 s à chaque fois dans la glace à 2 min d'intervalle, permettant ainsi au matériel de rester froid. Le produit est centrifugé à 10 000 g pendant 20 min. Le surnageant est distribué en fractions aliquotes de 0,5 ml dans des microtubes à centrifugation et peut être conservé à -70 °C pendant des années. La présence d'antigènes hétérologues de bactéries commensales n'interfère pas avec la liaison entre les anticorps spécifiques anti-piroplasme ou entre les anticorps monoclonaux appariés, et leurs épitopes antigéniques recombinants respectifs et ceci est confirmé par les procédures suivantes. Les antigènes contenus dans le surnageant sont contrôlés qualitativement en les titrant avec les AcM appariés correspondants et avec des anti-sérums équins monospécifiques de référence afin de vérifier à la fois une concentration adéquate et une totale spécificité vis-à-vis de l'espèce homologue de piroplasme. Les sérums témoins négatifs doivent ne pas interférer lors de la liaison entre les AcMs ou le sérum témoin positif de référence et la préparation antigénique.

- **Protocole**

- Les plaques sont préparées en recouvrant les puits avec 50 µl soit d'antigène de *T. equi*, soit d'antigène de *B. caballi* dilué dans le tampon de dilution des antigènes. La concentration retenue est déterminée par les techniques classiques de titrage. La plaque est recouverte, conservée une nuit à 4 °C et congelée à -70 °C. Les plaques stockées à -70 °C peuvent être conservées jusqu'à 6 mois.
- Les AcMs anti-*T. equi* et anti-*B. caballi* et l'anticorps conjugué à la peroxidase sont dilués selon les directives du fabricant au moment de l'emploi dans le c-ELISA, avec le tampon de dilution des anticorps (fourni dans le kit de diagnostic).

- iii) Les plaques sont décongelées à la température de la pièce, le tampon de dilution éliminé et les plaques sont rincées 2 fois avec le tampon c-ELISA.
- iv) Les sérums témoins et les sérums à tester sont dilués au 1/2 avec le tampon de dilution des sérums puis 50 µl de sérums sont ajoutés aux puits. Chaque sérum à tester est travaillé dans un ou deux puits. Le sérum témoin positif et les « blancs » sont testés en double alors que le sérum témoin négatif est testé en triple dans une zone différente de la plaque. Les plaques sont couvertes et température ambiante (entre 21 et 25 °C) pendant 30 min en étuve humide, puis lavées 3 fois dans la solution de rinçage c-ELISA.
- v) Chaque puits reçoit ensuite 50 µl d'AcM dilué anti-*T. equi* ou *B. caballi* (l'AcM est produit à partir de culture cellulaire et est disponible au *National Veterinary Services Laboratories*, P.O. Box 844, Ames, Iowa 50010, États-Unis d'Amérique). Les plaques couvertes sont incubées à température ambiante (entre 21 et 25 °C) pendant 30 min en étuve humide, lavées 3 fois avec la solution c-ELISA.
- vi) L'IgG anti-souris marquée à la peroxydase (50 µl/puits) est ajoutée à chaque puits. Les plaques couvertes sont incubées à température ambiante (entre 21 et 25 °C) pendant 30 min en étuve humide, puis lavées 3 fois avec la solution c-ELISA.
- vii) Le substrat chromogène (50 µl/puits) est ajouté à tous les puits. Les plaques sont incubées à la température de la pièce (entre 21 et 25 °C) pendant 15 min, pendant que se développe la coloration.
- viii) L'apparition de la couleur est stoppée en ajoutant 50 µl de solution de blocage dans tous les puits et les plaques sont lues immédiatement sur un lecteur de plaques.
- ix) Les plaques sont lues à 620, 630 ou 650 nm (DO). La densité optique moyenne DO₅₉₀ est calculée pour tous les puits dupliqués pour tous les sérums témoins et les puits « blancs ». Pour valider le test, le sérum témoin négatif doit donner une DO > 0,300 et < 2,000. Les sérums témoins positifs doivent réduire l'intensité de la couleur supérieure à 40 %.
- x) Le pourcentage d'inhibition (%I) est calculé de la façon suivante :

$$\%I = 100 - ([DO \text{ échantillon} \times 100] \div [DO \text{ moyenne des témoins négatifs}])$$
- xi) Si l'échantillon entraîne une inhibition de 40 % et plus, il est considéré positif. Si le sérum à tester entraîne une inhibition inférieure à 40 %, il est considéré négatif.

c) Fixation du complément

La fixation du complément (FC) fut dans le passé le premier test utilisé par certains pays pour contrôler des chevaux d'importation (48). Une description détaillée de production d'antigènes et le protocole du test ont été donnés par exemple par le département de l'agriculture des USA (7, 9, 50). La réaction de FC peut ne pas identifier des animaux infectés, en particulier ceux qui ont été traités et à cause des propriétés anti-complément de certains sérums et de l'incapacité des IgG(T) (isotype majeur des équidés) à fixer le complément de cobaye (31). Par conséquent, l'IFI et le c-ELISA ont remplacé la réaction de FC comme épreuves prescrites pour les échanges internationaux.

Un exemple de protocole de ce test de FC est donné ci-dessous.

• Solutions

Solution d'Alsever : préparer 1 litre de solution d'Alsever en faisant dissoudre 20,5 g de glucose, 8 g de citrate de soude et 4,2 g de chlorure de sodium dans un volume suffisant d'eau distillée. Ajuster à pH 6,1 en utilisant de l'acide citrique, et compléter à 1 litre en ajoutant de l'eau distillée. Stériliser par filtration.

Tampon véronal (5×) : dissoudre dans 1 litre d'eau distillée : 85 g de chlorure de sodium ; 3,75 g d'acide 5,5-diéthylbarbiturique, 1,68 g de chlorure de magnésium (MgCl₂, 6H₂O), 0,28 g de chlorure de calcium. Dissoudre 5,75 g d'acide 5,5-diéthylbarbiturique dans 0,5 litre d'eau chaude distillée (prête à bouillir). Refroidir et ajouter la solution salée. Compléter à 2 litres avec l'eau distillée et conserver à 4 °C. Pour adapter au test, mélanger une part de la solution stock et 4 parts d'eau distillée. Le pH final doit être entre 7,4 et 7,6.

• Production d'antigènes

Prélever du sang de chevaux à forte parasitémie (c'est à dire 3 à 7 % pour *B. caballi*, 60 à 85 % pour *T. equi*) et mélanger à volume égal avec la solution d'Alsever comme anticoagulant. La couche interface entre le plasma et la solution d'Alsever, ainsi que le *buffy coat* sont recueillis quand les globules rouges ont atteint le bas du récipient. Les globules rouges sont rincés plusieurs fois avec du tampon véronal froid puis hémolysés. L'antigène est recueilli à partir du lysat par centrifugation à 30 900 g pendant 30 min.

L'antigène est lavé plusieurs fois dans du tampon véronal froid par centrifugation à 20 000 *g* pendant 15 min. Du polyvinyl pyrrolidone 40 000 (1-5 % [w/v]) est ajouté comme stabilisant et la préparation est mélangée par agitateur magnétique pendant 30 min, passée sur deux épaisseurs de compresses stériles, distribuée en volumes de 2 ml et congelée. L'antigène peut être conservé à –50 °C pendant des années.

• **Protocole**

- i) La spécificité et la capacité de chaque lot d'antigène doivent être testées à l'encontre d'antisérums de référence de spécificité et capacité connues. La dilution optimale de l'antigène est déterminée précédemment selon une procédure de contrôle du titrage.
- ii) Les sérums à tester sont inactivés pendant 30 min à 58 °C (les sérums de mule et d'âne inactivés à 62,5 °C pendant 35 min) et testés aux dilutions de 1/5 à 1/5120. Le tampon au véronal est utilisé pour toutes les dilutions.
- iii) Le complément est préparé et titré au spectrophotomètre pour déterminer la dose hémolytique 50 (C'H₅₀) (45) et utilisé à 5 fois la C'H₅₀. Le couple hémolytique consiste en parts égales d'une suspension de globules rouges de mouton à 2 % et de tampon au véronal avec 5 doses hémolytiques minimales (DHMs) d'hémolysine (amceptor) (50). Certains laboratoires utilisent 2 fois la dose hémolytique à 100 % ce qui donne une sensibilité équivalente.
- iv) Le test est adapté aux microplaques (11). Le volume total à tester est de 0,125 ml, constitué à proportions égales (0,025 ml) d'antigène, de complément (5 fois la CH₅₀) et de sérum dilué. Incuber pendant 1 h à 37 °C.
- v) Une double quantité (0,05 ml) de système hémolytique est ajouté et les plaques incubées de nouveau pendant 45 min à 37 °C en agitant après 20 min.
- vi) Les plaques sont centrifugées pendant 1 min à 200 *g* avant la lecture au-dessus d'un miroir.
- vii) Une lyse de 50 % est considérée comme positive au titre de la plus grande dilution donnant 50 % de lyse. Un titre de 1/5 est considéré comme positif. Un jeu de témoin (sérums positif et négatif) doit être inclus dans chaque test ainsi que l'antigène témoin issu de globules rouges de cheval sain.

Les échantillons anti-complémentaires sont examinés en IFI. Les sérums d'âne sont fréquemment anti-complémentaires.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'y a ni vaccins ni produits biologiques de disponible.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALHASSAN A., GOVIND Y., TAM, N., THEKISOE O., YOKOYAMA N., INOUE N. & IGARASHI I. (2007). Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and *in vitro* culture methods for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Parasitol. Res.*, **100**, 1165–1168.
2. ALHASSAN A., PUMIDONMING W., OKAMURA M., HIRATA H., BATTSETSEG B., FUJISAKI K., YOKOYAMA N. & IGARASHI I. (2005). Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Vet. Parasitol.*, **129**, 43–49.
3. ALLSOPP M.T.E.P., CAVALIER-SMITH T., DE WAAL D.T. & ALLSOPP B.A. (1994). Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitol.*, **108**, 147–152.
4. BASHIRUDDIN J.B., CAMMA C. & REBELO E. (1999). Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Vet. Parasitol.*, **84**, 75–83.
5. BROWN G.M. (1979). Equine piroplasmosis complement fixation test antigen production. USDA, APHIS, National Veterinary Services Laboratories. Diagnostic Reagents Laboratory, Ames, Iowa. USA NVSL Diagnostic Production Guide No. R-72/73/74.

6. CRIADO-FORNELIO A., MARTINEZ-MARCOS A., BULING-SARANA A., & BARBA-CARRETERO J.C. (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet. Parasitol.*, **114**, 173–194.
7. DE WAAL D.T. & POTGIETER F.T. (1987). The transstadial transmission of *Babesia caballi* by *Rhipicephalus evertsi evertsi*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **54**, 655–656.
8. DONNELLY J., JOYNER L.P., GRAHAM-JONES O. & ELLIS C.P. (1980). A comparison of the complement fixation and immunofluorescent antibody titres in a survey of the prevalence of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horses in the Sultanate of Oman. *Trop. Anim. Health Prod.*, **12**, 50–60.
9. FRERICHS W.M., HOLBROOK A.A. & JOHNSON A.J. (1969). Equine piroplasmosis: Complement-fixation titres of horses infected with *Babesia caballi*. *Aust. J. Vet. Res.*, **30**, 697–702.
10. FRIEDHOFF K. (1970). Studies on the fine structure of *Babesia bigemina*, *B. divergens* and *B. ovis*. Proceedings of the Second International Congress of Parasitology, *J. Parasitol.*, **56**, Section 2 (1), 110.
11. HERR S., HUCHZERMAYER H.F.K.A., TE BRUGGE L.A., WILLIAMSON C.C., ROOS J.A. & SCHIELE G.J. (1985). The use of a single complement fixation test technique in bovine brucellosis, Johne's disease, dourine, equine piroplasmosis and Q fever serology. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **52**, 279–282.
12. HIRATA H., IKADAI H., YOKOYAMA N., XUAN X., FUJISAKI K., SUZUKI N., MIKAMI T. & IGARASHI I. (2002). Cloning of a truncated *Babesia equi* gene encoding an 82-kilodalton protein and its potential use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 1470–1474.
13. HIRATA H., YOKOYAMA N., XUAN X., FUJISAKI K., SUZUKI N. & IGARASHI I. (2005). Cloning of a novel *Babesia equi* gene encoding a 158-kilodalton protein useful for serological diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 334–338.
14. HOLBROOK A.A., JOHNSON A.J. & MADDEN B.S. (1968). Equine piroplasmosis: Intraerythrocytic development of *Babesia caballi* (Nuttall) and *Babesia equi* (Laveran). *Am. J. Vet. Res.*, **29**, 297–303.
15. HOLMAN P.J., CHIEVES L., FRERICHS W.M., OLSON D. & WAGNER G.G., 1994. *Babesia equi* erythrocytic stage continuously cultured in an enriched medium. *J. Parasitol.*, **80**, 232–236.
16. HOLMAN P.J., FRERICHS W.M., CHIEVES L. & WAGNER G.G. 1993. Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 698–701.
17. HUANG X., XUAN X., XU L., ZHANG S., YOKOYAMA N., SUZUKI N., & IGARASHI I. (2004). Development of an immunochromatographic test with recombinant EMA-2 for the rapid detection of antibodies against *Babesia equi* in horses. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 359–361.
18. HUANG X., XUAN X., YOKOYAMA N., XU L., SUZUKI H., SUGIMOTO C., NAGASAWA H., FUJISAKI K. & IGARASHI I. (2003). High-level expression and purification of a truncated merozoite antigen-2 of *Babesia equi* in *Escherichia coli* and its potential for immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1147–1151.
19. IKADAI H., OSORIO C.R., XUAN X., IGARASHI I., KANEMARU T., NAGASAWA H., FUJISAKI K., SUZUKI N. & MIKAMI T. (2000). Detection of *Babesia caballi* infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant 48-kDa merozoite rhoptry protein. *Int. J. Parasitol.*, **30**, 633–635.
20. IKADAI H., XUAN X., IGARASHI I., TANAKA S., KANEMARU T., NAGASAWA H., FUJISAKI K., SUZUKI N. & MIKAMI T. (1999). Cloning and expression of a 48-kilodalton *Babesia caballi* merozoite rhoptry protein and potential use of the recombinant antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3475–3480.
21. 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* recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 2285–2290.
22. KAPPMAYER L.S., PERRYMAN L.E. & KNOWLES D.P. (1993). A *Babesia equi* gene encodes a surface protein with homology to *Theileria* species. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **62**, 121–124.
23. KATZ J., DEWALD R. & NICHOLSON J. (2000). Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum* and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 46–50.

24. KNOWLES D.P., KAPPMAYER, L.S. & PERRYMAN L.E. (1997). Genetic and biochemical analysis of erythrocyte-stage surface antigens belonging to a family of highly conserved proteins of *Babesia equi* and *Theileria* species. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **90**, 69–79.
25. 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.
26. KNOWLES D.P., PERRYMAN L.E. & KAPPMAYER L.S. (1991). Detection of equine antibody to *Babesia equi* merozoite proteins by a monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2056–2058.
27. LEVINE N.D. (1985). Veterinary protozoology. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
28. LITTLEJOHN A. (1963). Babesiosis. In: Equine Medicine and Surgery, Bone J.F., Catcott E.J., Gabel A.A., Johnson L.E. & Riley W.F., eds. American Veterinary Publications, California, USA, 211–220.
29. MADDEN P.A. & HOLBROOK A.A. (1968). Equine piroplasmosis: Indirect fluorescent antibody test for *Babesia caballi*. *Am. J. Vet. Res.*, **29**, 117–123.
30. MAHONEY D.F. & SAAL J.R. (1961). Bovine babesiosis: Thick blood films for the detection of parasitaemia. *Aust. Vet. J.*, **37**, 44–47.
31. MCGUIRE T.C., VAN HOOSIER G.L. JR & HENSON J.B. (1971). The complement-fixation reaction in equine infectious anemia: demonstration of inhibition by IgG (T). *J. Immunol.*, **107**, 1738–1744.
32. MEHLHORN H. & SCHEIN E. (1984). The piroplasms: Life cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol.*, **23**, 37–103.
33. MELHORN H. & SCHEIN E. (1998). Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi*. *Parasitol Res.*, **84**, 467–475.
34. MORZARIA S.P., BROCKLESBY D.W. & HARRADINE D.L. (1977). Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for *Babesia major* and *Theileria mutans* in Britain. *Vet. Rec.*, **100**, 484–487.
35. NAGORE D., GARCIA-SANMARTIN J., GARCIA-PEREZ A.L., JUSTE R.A. & HURTADO A. (2004). Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. *Vet. Parasitol.*, **123**, 41–54.
36. NEITZ W.O. (1956). Classification, transmission and biology of piroplasms of domestic animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **64**, 56–111.
37. POTGIETER F.T. & ELS H.J. (1977). The fine structure of intra-erythrocytic stages of *Babesia bigemina*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **44**, 157–168.
38. RAMPERSAD J., CESAR E., CAMPBELL M.D., SAMLAL M., & AMMONS, D. (2003). A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Vet. Parasitol.*, **114**, 81–87.
39. RHALEM A., SAHIBI H., LASRI S., JOHNSON W.C., KAPPMAYER L.S., HAMIDOUCH A., KNOWLES D.P. & GOFF W.L. (2001). Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosing *Babesia equi* infections of Moroccan origin and its use in determining the seroprevalence of *B. equi* in Morocco. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 249–251.
40. SAHAGUN-RUIZ A., WAGNELA S.D., HOLMAN P.J., CHIEVES L.P. & WAGNER G.G. (1997). Biotin-labeled DNA probe in a PCR-based assay increases detection sensitivity for the equine hemoparasite *Babesia caballi*. *Vet. Parasitol.*, **73**, 53–63.
41. SCHEIN E., REHBEIN G., VOIGT W.P. & ZWEYGARTH E. (1981). *Babesia equi* (Leveran, 1901). Development in horses and in lymphocyte culture. *Tropenmed Parasitol.*, **32**, 223–227.
42. SHKAP V., COHEN I., LEIBOVITZ B., SAVITSKY, PIPANO E., AVNI G., SHOFR S., GIGER U., KAPPMAYER L. & KNOWLES D. (1998). Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays. *Vet. Parasitol.*, **76**, 251–259.

43. SHUTE P.G. (1966). The staining of malaria parasites. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **60**, 412–416.
44. STILLER D. & FRERICH S.W.M. (1979). Experimental transmission of *Babesia caballi* to equids by different stages of the tropical horse tick, *Anocentor nitens*. *Recent Adv. Acarol.*, **2**, 262–268.
45. STILLER D., FRERICH S.W.M., LEATCH G. & KUTTLER K.L. (1980). Transmission of equine babesiosis and bovine anaplasmosis by *Dermacentor albipictus* (Packard) (Acari: Ixodidae). *J. N.Y. Ent. Soc.*, **88**, 75–76.
46. TAMAKI Y., HIRATA H., TAKABATAKE N., BORK S., YOKOYAMA N., XUAN X., FUJISAKI K. & IGARASHI I. (2004). Molecular cloning of a *Babesia caballi* gene encoding the 134-kilodalton protein and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **11**, 211–215.
47. TANAKA T., XUAN X., IKADAI H., IGARASHI I., NAGASAWA H., FUJISAKI K., MIKAMI T. & SUZUKI N. (1999). Expression of *Babesia equi* merozoite antigen-2 by recombinant baculovirus and its use in the ELISA. *Int. J. Parasitol.*, **29**, 1803–1808.
48. TAYLOR W.M., BRYANT J.E., ANDERSON J.B. & WILLERS K.H. (1969). Equine piroplasmosis in the United States – A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **155**, 915–919.
49. TENTER A.M. & FREIDHOFF K.T. (1986). Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. *Vet. Parasitol.*, **20**, 49–61.
50. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE, VETERINARY SERVICES (1997). Complement fixation test for the detection of antibodies to *Babesia caballi* and *Babesia equi* – microtitration test. USDA, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.
51. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE, VETERINARY SERVICES (2005). Competitive ELISA for Serodiagnosis of Equine Piroplasmosis (*Babesia equi* and *Babesia caballi*), USDA, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.
52. XUAN X., LARSEN A., IKADAI H., TNANKA T., IGARASHI I., NAGASAWA H., FUJISAKI K., TOYODA Y., SUZUKI N. & MIKAMI T. (2001). Expression of *Babesia equi* merozoite antigen 1 in insect cells by recombinant baculovirus and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 705–709.
53. ZWEYGARTH E., JUST M.C. & DE WAAL D.T. (1995). Continuous *in vitro* cultivation of erythrocytic stages of *Babesia equi*. *Parasitol. Res.*, **81**, 355–358.
54. ZWEYGARTH E., JUST M.C. & DE WAAL D.T. (1997). *In vitro* cultivation of *Babesia equi*: detection of carrier animals and isolation of parasites. *Onderstepoort J. Vet Res.*, **64**, 51–56.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de Référence de l'OIE pour la piroplasmose équine (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).

RHINOPNEUMONIE ÉQUINE

RÉSUMÉ

La rhinopneumonie équine (RE) est un terme général pour désigner plusieurs entités pathologiques, fortement contagieuses, des équidés. Les agents responsables sont les herpèsvirus équins -1 et -4 (EHV-1 et EHV-4).

L'infection par l'EHV-1 ou l'EHV-4 est caractérisée par une maladie primaire du tractus respiratoire d'une gravité variable selon l'âge et l'état immunitaire de l'animal infecté. L'infection par l'EHV-1 en particulier est capable de progresser au-delà de la muqueuse respiratoire et provoque des maladies plus sévères qui peuvent se manifester par des avortements, des mortalités périnatales ou des dysfonctionnements neurologiques.

Identification de l'agent pathogène : *la méthode de référence d'identification des herpèsvirus responsables de la rhinopneumonie équine reste l'isolement viral à partir de prélèvements provenant d'animaux malades ou morts. L'isolement doit être complété par une confirmation sérologique de son identité. Les virus peuvent être isolés en culture de cellules à partir d'échantillons nasopharyngés prélevés sur les chevaux durant la période fébrile de l'infection, mais aussi à partir du foie, des poumons, de la rate, ou du thymus des fœtus avortés et des poulains morts précocement, et à partir des leucocytes du sang des animaux infectés par l'EHV-1. Une identification sans équivoque d'isolats viraux appartenant à l'espèce d'EHV-1 ou d'EHV-4 peut être réalisée par immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux spécifiques.*

Un diagnostic d'avortement dû à l'EHV-1 peut être réalisé rapidement par détection d'antigènes viraux au moyen de l'immunofluorescence directe sur des coupes de tissus d'un avorton par l'utilisation d'un antisérum polyclonal conjugué.

Des méthodes sensibles et fiables de détection des EHV-1/4, comme une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ou le marquage par immunoperoxydase, ont été développées. Ce sont des compléments utiles aux techniques classiques de culture de virus dans le but de diagnostiquer la RE.

Les lésions histopathologiques post-mortem du à l'EHV-1 peuvent compléter le diagnostic de laboratoire. Les tissus concernés proviennent de fœtus avortés, de poulain mort juste après la naissance ou du système nerveux central des animaux affectés par la forme nerveuse.

Épreuves sérologiques : *étant donné que la plupart des chevaux sont séropositifs pour les EHV-1/4, la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum collecté à partir d'un simple échantillon de sang n'est pas suffisante comme confirmation diagnostique de rhinopneumonie. Pour obtenir un diagnostic sérologique valable il faut utiliser des sérums couplés : deux prélèvements de sang doivent être réalisés sur les animaux soupçonnés d'être infectés par l'EHV-1 ou l'EHV-4, le premier en phase aiguë et le second pendant la période de convalescence. En cas d'infection, on attend une augmentation de 4 fois ou plus du titre en anticorps spécifiques. Plusieurs techniques sont utilisées : la fixation du complément (FC), la séroneutralisation du virus, ou la méthode immuno-enzymatique (ELISA).*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *des vaccins atténués et inactivés de composition variée sont disponibles sur le marché et sont utilisés pour le contrôle de la RE. Bien que la vaccination soit utile pour réduire l'incidence des avortements chez les juments, et dans l'atténuation de la sévérité des signes cliniques des infections respiratoires chez les jeunes chevaux, elle ne doit pas être considérée comme le seul moyen pour réduire le risque de rhinopneumonie en l'absence de mesures sanitaires. Comme la*

durée de l'immunité induite par la vaccination est relativement courte, des rappels de vaccination à intervalle régulier sont recommandés avec chaque produit.

Les normes de production et d'autorisation des vaccins atténués et inactivés EHV sont établies par l'agence des médicaments vétérinaires appropriée dans le pays de fabrication et d'utilisation du vaccin. Un ensemble unique de normes internationales reconnues pour les vaccins EHV n'est pas disponible. Dans tous les cas, cependant, la production de vaccin est basée sur un système de plan détaillé de production employant une lignée cellulaire bien caractérisée et des lots de semences primaires de virus vaccinal identifiés et validés en ce qui concerne la sécurité, la pureté virologique, l'immunogénicité, et l'absence d'agent microbiens étrangers.

A. INTRODUCTION

La rhinopneumonie équine (RE) est une dénomination historique qui décrit un ensemble de plusieurs entités pathologiques observées chez les chevaux. Il comprend des maladies respiratoires, des avortements, des pneumonies néonatales, ou des myéloencéphalopathies (1, 2, 5, 7). Il y a environ 60 ans, la maladie a été reconnue comme une menace pour l'industrie internationale du cheval, elle est causée par deux membres de la famille des *Herpesviridae*, l'herpèsvirus équin-1 et l'herpèsvirus équin-4 (l'EHV-1 et l'EHV-4). L'EHV-1 et l'EHV-4 sont des alphaherpèsvirus très proches. Leur similitude de séquences nucléotidiques au niveau des gènes homologues se situe entre 55 % à 84 %, et les similitudes au niveau des séquences d'acides aminés de 55 % à 96 % (13, 14). Les deux herpèsvirus sont enzootiques dans tous les pays qui possèdent une population importante de chevaux et dans lesquels ils font partie intégrante des traditions culturelles et de l'économie agricole. Il n'y a pas de risque pour la santé humaine.

La RE est fortement contagieuse au sein de la population équine sensible. La transmission se fait par inhalation de sécrétions respiratoires contenant du virus. L'utilisation extensive des vaccins n'a pas éliminé les infections dues aux EHV-1/4, et les conséquences financières annuelles de cet agent pathogène à travers le monde sont importantes.

Chez les chevaux de moins de 3 ans, la rhinopneumonie s'exprime cliniquement par une maladie respiratoire aiguë et fébrile qui se répand rapidement au sein du groupe d'animaux. Le virus infecte et se multiplie dans les cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire. La période d'incubation est de 2 à 8 jours. Les premiers signes cliniques sont de la fièvre, de l'inappétence, de l'abattement et du jetage. La sévérité de la maladie respiratoire varie avec l'âge du cheval et le niveau de l'immunité résultant des vaccinations antérieures ou des expositions naturelles. Les infections subcliniques dues aux EHV-1/4 sont fréquentes, même chez les jeunes animaux. Bien que la mortalité soit rare pour la rhinopneumonie et que la guérison soit généralement complète après 1 à 2 semaines, l'infection respiratoire est une cause fréquente et non négligeable d'interruption du programme d'entraînement, de la participation aux courses, ou à d'autres compétitions équestres. L'immunité protectrice totale résultant d'une infection est de courte durée, et les animaux en convalescence sont susceptibles d'être ré-infectés par les EHV-1/4 après plusieurs mois. Les ré-infections par les deux herpèsvirus causent une maladie respiratoire moins sévère ou cliniquement inapparente, mais les risques d'avortement et/ou d'atteinte du système nerveux central ne sont pas éliminés. Les menaces cliniques les plus importantes pour les chevaux d'élevage, de course ou les chevaux de loisirs sont les conséquences abortives et nerveuses potentielles que peut provoquer une infection par l'EHV-1.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène (3)

Des méthodes de diagnostic rapides sont importantes étant donné la contagiosité de la rhinopneumonie, sa potentialité de produire une épizootie, le taux de mortalité important lors d'avortement ou de séquelles nerveuses. Plusieurs techniques de diagnostic novatrices et rapides ont été récemment décrites. Elles sont basées sur la méthode immuno-enzymatique (ELISA), des réactions d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), des marquages immunohistochimiques par peroxydase ou sur des hybridations avec des sondes d'acides nucléiques. Cependant leur utilisation est souvent réduite aux Laboratoires de référence spécialisés, c'est ainsi que la méthode de choix pour le diagnostic de la rhinopneumonie dans les laboratoires de virologie classique reste l'isolement en culture de cellules suivi par une séro-identification du virus isolé. La réussite de l'isolement des EHV-1/4 dépend du respect des méthodes en ce qui concerne le prélèvement et le traitement des échantillons par le laboratoire.

a) Récolte des échantillons

Pour un bon isolement viral, les échantillons de sécrétions nasopharyngées doivent être réalisés durant le début de la période fébrile de la maladie respiratoire. Ils sont collectés en tamponnant la région nasopharyngée via les naseaux au moyen d'une compresse de gaze de 5 × 5 cm attachée à l'extrémité d'un fil d'acier inoxydable flexible d'une longueur de 50 cm et emballé dans un tube en caoutchouc latex. Un écouvillon utérin peut aussi être utilisé. Après le prélèvement, la compresse sera enlevée de la tige et transportée immédiatement vers un laboratoire de virologie dans 3 ml de milieu de transport liquide froid (pas gelé) (milieu minimal essentiel [MEM] sans sérum et additionné d'antibiotiques). L'infectiosité peut être prolongée par l'addition d'albumine provenant de sérum bovin ou de gélatine à 0,1 % (poids/volume).

L'examen virologique des tissus d'avorton suspects d'EHV-1 se fait à partir d'échantillons de foie, de poumons, de thymus, et de rate prélevés stérilement. Les échantillons de tissus sont transportés au laboratoire et tenu à 4° C jusqu'à inoculation dans la culture de cellules. Les échantillons qui ne peuvent pas être traités dans les quelques heures seront stockés à -70 °C. Dans les cas neurologiques provoqués par l'EHV-1, le virus peut souvent être isolé à partir de la fraction leucocytaire du sang du cheval durant la phase aiguë de l'infection ou, moins souvent, à partir du nasopharynx des animaux infectés ou des animaux du troupeau. Pour les tentatives d'isolement du virus à partir des leucocytes du sang, il faut un échantillon de 20 ml de sang stérile, collecté dans un tube avec un anticoagulant citrate ou hépariné ; l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) ne doit pas être utilisé car il peut être toxique pour les cultures cellulaires). Les échantillons doivent être transportés sans délai sur de la glace (mais pas congelé) vers le laboratoire. Bien que le virus ait été isolé occasionnellement à partir de cerveau et de moelle épinière lors de mort par encéphalite due à l'EHV-1, les tentatives pour isoler le virus de cette manière sont souvent décevantes ; cependant de tels échantillons peuvent s'avérer intéressants pour une PCR.

b) Isolement du virus

Pour un isolement efficace de l'EHV-4 chez des chevaux atteints de maladie respiratoire, on doit utiliser des cultures cellulaires dérivées de cellules équines. L'EHV-1 et l'EHV-4 peuvent être isolés à partir d'échantillons nasopharyngés en inoculant des cellules fœtales de rein de cheval ou des souches de cellules fibroblastiques équines provenant du derme ou du tissu pulmonaire. L'EHV-1 peut être isolé sur d'autres types cellulaires, ce point sera discuté plus loin. L'écouvillon nasopharyngé accompagné de 3 ml de milieu de transport est transféré dans une seringue de 10 ml. Au moyen du piston de la seringue, l'écouvillon est pressé de manière à récolter le liquide dans un tube stérile. Une partie du fluide obtenu est alors filtré à travers un filtre membranaire stérile de 0,45 µm et est repris dans un second tube stérile. La filtration diminuera la contamination bactérienne, mais peut aussi faire baisser le titre viral. Des monocouches de cellules fraîchement préparées dans des boîtes de culture de tissu de 25 cm² sont inoculées d'une part avec 0,5 ml de filtrat et d'autre part avec l'extrait non filtré de l'échantillon nasopharyngé. Des cultures cellulaires dans des plaques multipuits incubées dans une atmosphère à 5 % de CO₂ peuvent aussi être utilisées. On permet au virus de s'attacher en incubant les monocouches inoculées à 37 °C pendant 1,5 à 2 h sur un plateau oscillant. Les monocouches de cellules témoins non-inoculées doivent être incubées en parallèle avec uniquement du milieu de transport stérile.

À la fin de la période d'attachement, l'inoculum est retiré et les monocouches sont rincées 2 fois avec une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) pour enlever les anticorps neutralisant le virus qui peuvent être présents dans les sécrétions nasopharyngiennes. Après addition de 5 ml de milieu de maintenance supplémenté (MEM contenant 2 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 2 fois la concentration de base en antibiotiques (pénicilline, streptomycine, gentamycine, et amphotéricine B), les boîtes sont incubées à 37 °C. L'utilisation d'un échantillon témoin de virus positif pour valider la procédure d'isolement comporte un risque dû au fait que cela peut conduire à une éventuelle contamination des échantillons à diagnostiquer. Ce risque peut être minimisé en utilisant les précautions de routine et une bonne technique de laboratoire, par l'utilisation d'une hotte à flux laminaire, en inoculant les témoins positifs après les échantillons à diagnostiquer, en décontaminant les surfaces de la hotte après l'adsorption du virus et en utilisant un témoin positif de bas titre. Les boîtes inoculées devront être inspectées chaque jour par microscopie pour repérer l'effet cytopathogène (ECP) caractéristique des herpèsvirus (cellules qui s'arrondissent, qui augmentent en réfraction et qui se détachent). Les cultures qui ne montrent aucune évidence d'ECP viral après une semaine d'incubation doivent être passées à l'aveugle dans des monocouches cellulaires fraîchement préparées, utilisant des petits aliquots du surnageant et des cellules déjà passées. Des passages en aveugle supplémentaires ne sont souvent pas productifs.

Différents types cellulaires peuvent être utilisés pour isoler l'EHV-1 de tissus d'avortons ou de cas morts d'encéphalite (ex : cellules de reins de lapin [RK-13], de reins d'hamster [BHK-21], de reins de bovin Madin-Darby [MDBK], de reins de porc [PK-15], etc.), mais les cultures dérivées de cellules équines sont les plus sensibles et doivent être utilisées si des cas peu fréquents d'avortement dus à l'EHV-4 ont été détectés. Un homogénat comprenant 10 % de tissus du foie, du poumon, du thymus et de la rate (de fœtus avortés) ou du tissu du système nerveux central (de cas d'encéphalite) sont utilisés pour l'isolement. Ceux-ci sont préparés par un premier hachage en petits échantillons de tissus de 1 mm³ dans une boîte de Petri stérile

avec des ciseaux de dissection, suivis par une macération des cubes de tissus dans un milieu de culture sans sérum avec des antibiotiques au moyen d'un broyeur mécanique de tissus (ex. Ten-Broeck ou Stomacher). Après centrifugation à 1 200 *g* pendant 10 min, le surnageant est retiré et 0,5 ml sont inoculés en double sur une monocouche de cellules dans des boîtes de 25 cm². Ensuite les cellules inoculées sont incubées à 37 °C pendant 1,5 à 2 h, l'inoculum est retiré et les monocouches sont rincées 2 fois avec du PBS. Après addition de 5 ml de milieu de maintenance supplémenté, les fioles sont incubées à 37 °C pendant plus d'une semaine ou jusqu'à l'observation d'un ECP.

La mise en culture de leucocytes périphériques du sang peut être tentée dans le but de détecter l'EHV-1 chez le cheval au cours de la phase précoce de la myélo-encéphalite. La fraction leucocytaire (*buffy coat*) peut être préparée à partir de sang non coagulé par centrifugation à 600 *g* pendant 15 min, puis récupérée après que le plasma ait été retiré délicatement. Le *buffy coat* est alors placé sur un coussin de Ficoll 1.090, et centrifugé à 400 *g* pendant 20 min. L'interface riche en leucocytes est prélevée et déposée sur un coussin de Ficoll 1.077 et centrifugée de la même façon. L'interface (sans la plupart des granulocytes) est lavée 2 fois dans du PBS (300 *g* pendant 10 min) et resuspendue dans 1 ml de MEM contenant 2 % de SVF. Alors, 0,5 ml de suspension cellulaire rincée est ajoutée en double à une monocouche de fibroblastes équins ou de cellules fœtales équines ou encore de cellules de RK-13 dans des boîtes de 25 cm² contenant 8 à 10 ml de milieu de maintenance fraîchement ajouté. Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 7 jours ; l'inoculum n'est pas retiré. Vu que l'ECP peut être difficile à détecter en présence de l'inoculum massif de leucocytes, chaque boîte de cellules est gelée et décongelée après 7 jours d'incubation et les contenus sont centrifugés à 300 *g* pendant 10 min. Finalement, 0,5 ml du surnageant du milieu sont transférés sur des monocouches cellulaires fraîchement préparées et qui viennent d'arriver à confluence. Celles-ci sont incubées et observées pour l'ECP viral pendant au moins 5 à 6 jours avant d'être considérées comme négatives.

c) Confirmation sérologique de l'identité du virus

Le principe de base de l'identification de tout herpèsvirus isolé d'échantillons testés provenant de cas suspect de rhinopneumonie est leur réactivité immunologique avec un antisérum spécifique. L'identification spécifique d'un isolat comme l'EHV-1 ou l'EHV-4 peut être rapidement et facilement réalisée grâce à une détection d'un antigène viral dans les cultures de cellules infectées par immunofluorescence (IF) en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques (AcMs). Ces derniers sont disponibles dans les Laboratoires de références de l'OIE spécialisés dans le diagnostic de la rhinopneumonie équine. Cette épreuve, qui est spécifique et précise, peut être réalisée sur un petit aliquot de cellules inoculées avec du matériel infectieux de cas clinique ou d'autopsie. Un isolat obtenu dans un laboratoire ne possédant ni d'AcMs ni d'équipement pour une épreuve d'IF peut être identifié comme EHV-1/4 par séroneutralisation virale en utilisant soit un antisérum polyclonal spécifique du virus, soit la PCR (voir section B.1.f).

Les monocouches cellulaires infectées avec l'isolat sont enlevées par raclage quand au moins 75 % d'ECP sont observés. Les cellules sont centrifugées hors du milieu de culture et resuspendues dans 0,5 ml de PBS. 50 µl de la suspension cellulaire sont placés dans deux puits d'une plaque multi-puits, séchés à l'air, et fixés pendant 10 min avec de l'acétone 100 %. Les suspensions cellulaires témoin (non infectées, infectées par l'EHV-1, ou infectées par l'EHV-4) sont aussi déposées sur la même plaque. Les cellules témoins peuvent être préparées à l'avance et stockées au congélateur dans de petits aliquots. Une goutte d'une dilution appropriée d'AcMs spécifiques de l'EHV-1 est ajoutée à un puits de chaque paire de suspension cellulaire, et une goutte d'AcMs spécifiques de l'EHV-4 est ajoutée à chacun des autres puits. Après 30 min d'incubation à 37 °C dans une chambre humide, les anticorps qui n'ont pas réagi sont enlevés par deux lavages de 10 min avec du PBS. Les AcMs liés aux antigènes viraux peuvent être détectés avec des IgG de chèvre anti-souris conjugués avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Une goutte de diluant conjugué est ajoutée à chaque puits et, après 30 min à 37 °C, les puits sont à nouveau lavés 2 fois avec du PBS. Les cellules sont examinées avec un microscope à fluorescence. Une fluorescence positive avec l'anticorps spécifique indique le type de virus.

d) Détection du virus par immunofluorescence directe

La détection d'antigène de l'EHV-1 par immunofluorescence directe dans des échantillons de tissus récoltés provenant d'avortons de cheval constitue une méthode indispensable pour les laboratoires de diagnostic vétérinaire dans le but d'obtenir un diagnostic préliminaire rapide d'avortement à herpèsvirus (9). La comparaison des techniques d'immunofluorescence et d'isolement en culture de cellules sur plus de 100 cas d'avortements équins ont fourni la preuve que la fiabilité du diagnostic par immunofluorescence directe sur du tissu fœtal obtenu à l'autopsie est équivalente à celle des épreuves d'isolement viral à partir du même tissu. Aux États-Unis d'Amérique (USA), un puissant antisérum polyclonal spécifique de l'EHV-1, préparé à partir de porcs et conjugué avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), est fourni aux laboratoires de diagnostic vétérinaire par les Laboratoires des Services Vétérinaires Nationaux du Département de l'agriculture des USA (USDA). L'antisérum réagit avec l'EHV-4 et en conséquence ne peut pas être utilisé pour le sérotypage. Des échantillons fraîchement disséqués (pièces de 5 × 5 mm) de tissus fœtal (poumons, foie, thymus, et rate) sont congelés, sectionnés au cryostat à –20 °C, montés sur une lame

pour microscopie, et fixés dans de l'acétone 100 %. Après séchage à l'air, les coupes sont incubées à 37 °C dans une atmosphère humide pendant 30 min avec une dilution appropriée d'anticorps conjugués de porc contre l'EHV-1. Les anticorps qui n'ont pas réagi sont enlevés par deux lavages dans du PBS. Les coupes de tissus sont alors couvertes d'une solution aqueuse et d'une lame couvre-objet, et examinées. Les cellules fluorescentes indiquent la présence d'antigène d'EHV. Chaque épreuve doit inclure un témoin positif et négatif consistant en une coupe de tissus fœtal de statut connu infecté ou non-infecté par l'EHV-1.

e) Détection du virus par coloration au moyen d'une immunoperoxydase

Des méthodes de coloration immunohistochimique (IH) enzymatique (ex. immunoperoxydase) ont été développées récemment comme procédure pour détecter les antigènes de l'EHV-1 dans des tissus inclus dans de la paraffine provenant de poulains avortés ou de chevaux avec une atteinte nerveuse (12, 20). De telles techniques auxiliaires d'IH pour la détection d'antigènes peuvent faciliter l'identification du virus dans des échantillons de tissus archivés ou des cas cliniques pour lesquels les méthodes de laboratoire traditionnelles pour la détection de l'EHV-1 ont échoué. Des colorations immuno-enzymatiques spécifiques de l'EHV-1 sont particulièrement utiles pour l'identification simultanée des lésions morphologiques et de l'agent infectieux. La coloration à l'immunoperoxydase pour EHV-1 ou EHV-4 peut aussi être réalisée sur des cultures cellulaires infectées (16). Des témoins adéquats doivent être inclus avec chaque test d'immunoperoxydase pour l'évaluation de la spécificité de la méthode et la spécificité des anticorps.

f) Détection du virus par réaction de polymérisation en chaîne

La PCR peut être utilisée pour une détection rapide d'acides nucléiques des EHV-1 et -4 dans des échantillons cliniques, dans des tissus archivés inclus dans de la paraffine, ou à partir de cultures de cellules inoculées en vue d'isolement viral (4, 10, 11, 17, 18). Plusieurs amorces spécifiques ont été mises au point pour distinguer la présence de l'EHV-1 et de l'EHV-4. La corrélation entre la PCR et les techniques d'isolement viral pour le diagnostic de l'EHV-1 et l'EHV-4 est valable (17). Le diagnostic de la rhinopneumonie par PCR est rapide, sensible et ne dépend pas de la présence de virus infectieux dans l'échantillon clinique. Elle fait maintenant partie intégrante de l'éventail des épreuves couramment disponibles pour diagnostiquer la rhinopneumonie, chacune présentant ses propres avantages et limites.

Pour le diagnostic d'une infection aiguë par les EHV, les méthodes de PCR sont très efficaces avec des échantillons d'avortons ou d'écouvillon nasopharyngé et de leucocytes du sang périphérique de poulains ou de yearlings ; elles sont particulièrement utiles dans les avortements épizootiques explosifs ou les maladies du tractus respiratoire dans lesquels une identification rapide du virus est primordiale pour orienter les stratégies de gestion. Les PCR réalisées sur de la moelle épinière, du tissu cérébral ou encore des leucocytes du sang périphérique sont importantes lorsque l'on cherche à poser un diagnostic sur un cheval avec des symptômes nerveux. Cependant, l'interprétation de l'amplification par PCR de fragments génomiques de l'EHV-1 ou de l'EHV-4 à partir des tissus de chevaux adultes (nœuds lymphatiques ou ganglion trijumeau) est difficile en raison de la forte prévalence d'infections latentes à EHV-1 et EHV-4 dans ces tissus (19).

Une réaction de PCR multiplex en une étape pour la détection simultanée de l'EHV-1 et de l'EHV-4 a été décrite (18). Un protocole plus sensible par PCR nichée de l'EHV-1 ou de l'EHV-4 à partir d'échantillons cliniques ou pathologiques (sécrétions nasales, leucocytes sanguins, cerveau et moelle épinière, tissus fœtaux, etc.) est décrite ci-dessous (4). Ce protocole a été utilisé avec succès ; cependant, la technologie dans ce domaine évolue rapidement, et des techniques plus simples et plus sensibles seront bientôt disponibles.

- i) *Préparer l'ADN matrice à partir de l'échantillon à tester* : après homogénéisation de l'échantillon et des cellules lysées en présence d'un sel chaotropique, les acides nucléiques sont liés sélectivement à des substrats résine de type silica ou cationique. Les acides nucléiques liés aux substrats sont purifiés dans une série d'étapes de lavages rapides suivie par la récupération au moyen d'une phase d'élution avec une solution faiblement concentrée en sel. Les réactifs nécessaires pour l'extraction rapide d'acides nucléiques sont disponibles sous forme de kit de diagnostic auprès de différentes firmes (ex. High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, USA ; QIAamp DNA, Qiagen, Valencia, USA).
- ii) *Séquences spécifiques d'amorces pour la PCR nichée de l'EHV-1* (sur la base de celles décrites dans la référence 4) :
 - BS-1-P1 = 5'-TCT-ACC-CCT-ACG-ACT-CCT-TC-3' (917-936)
 - gB1-R-2 = 5'-ACG-CTG-TCG-ATG-TCG-TAA-AAC-CTG-AGA-G-3' (2390-2363)
 - BS-1-P3 = 5'-CTT-TAG-CGG-TGA-TGT-GGA-AT-3' (1377-1396)
 - gB1-R-a = 5'-AAG-TAG-CGC-TTC-TGA-TTG-AGG-3' (2147-2127)

iii) *Séquences spécifiques d'amorces pour la PCR nichée de l'EHV-4 (4) :*

BS-4-P1 = 5'-TCT-ATT-GAG-TTT-GCT-ATG-CT-3' (1705–1724)

BS-4-P2 = 5'-TCC-TGG TTG-TTA-TTG-GGT-AT-3' (2656–2637)

BS-4-P3 = 5'-TGT-TTC-CGC-CAC-TCT-TGA-CG-3' (1857–1876)

BS-4-P4 = 5'-ACT-GCC-TCT-CCC-ACC-TTA-CC-3' (2456–2437)

- iv) *Conditions de PCR pour la première étape d'amplification :* l'ADN matrice de l'échantillon à tester (1 à 2 µg dans 2 µl) est ajouté à un mélange PCR (volume total de 50 µl) contenant du tampon PCR ×1 (50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, pH 9,0, 0,1 % Triton X-100), 200 µM de chaque désoxynucléotide triphosphate (dNTP), 2,5 mM MgCl₂, 2,0 µM de chaque amorce extérieure (BS-1P-1 et gB1-R-2 pour la détection de l'EHV-1 et, dans un mélange séparé, BS-4-P1 et BS-4-P2 pour la détection de l'EHV-4) et 0,5 Unité de Taq ADN polymérase. Les paramètres d'amplification sont : la dénaturation initiale à 94 °C pendant 4 min ; 40 cycles à 94 °C pendant 30 s, une étape à 60 °C pendant 30 s, et une étape à 72 °C pendant 90 s ; suivi d'une extension finale à 72 °C pendant 10 min. Des mélanges réactionnels séparés soit contenant l'ADN viral connu, soit sans ADN doivent être préparés et amplifiés comme témoin positif et négatif.
- v) *Les conditions de PCR pour la deuxième étape d'amplification (nichée) :* 2 µl d'une dilution à 1/10 du produit de la première amplification sont ajoutés à un mélange frais de PCR (volume total 50 µl) contenant le tampon PCR ×1, 200 µM de chaque dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 2,0 µM de chaque amorce (BS-1-P3 et gB1-R-a pour la détection de l'EHV-1 et dans un mélange réactionnel séparé, BS-4-P3 et BS-4-P4 pour la détection de l'EHV-4) et 0,5 u de Taq ADN polymérase. Les paramètres sont : dénaturation initiale à 94 °C pendant 4 min ; 40 cycles de 94 °C pendant 30 s, 60 °C pendant 30 s, et 72 °C pendant 1 min ; avec une extension finale à 72 °C pendant 10 min.
- vi) *Analyse par électrophorèse des produits amplifiés :* 10 µl de chaque produits finaux amplifiés, incluant les témoins, sont mélangés avec 2 µl de colorant concentré 6 fois et analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % dans un tampon Tris/acétate, avec un marqueur de taille moléculaire de 100 pb. Le gel est baigné dans une solution de bromure d'éthidium et soumis à une transillumination aux UV pour permettre la visualisation des produits amplifiés de 770 pb pour l'EHV-1 ou 580 pb pour l'EHV-4.

g) Histopathologie

L'examen histopathologique de coupes de tissus d'avortons ou de chevaux affectés neurologiquement fixées et intégrées dans de la paraffine constitue une partie importante du diagnostic de laboratoire de ces deux manifestations cliniques de la rhinopneumonie. Chez les avortons, la présence de corps d'inclusion intranucléaire typiques des herpèsvirus au niveau de l'épithélium des bronchioles ou dans les cellules en périphérie des zones de nécrose hépatique sont des lésions pathognomoniques de l'EHV-1. Une caractéristique non pathognomonique des lésions microscopiques associées à l'encéphalite due à l'EHV-1 est une angéite thrombosante dégénérative des petits vaisseaux sanguins dans le cerveau ou la moelle épinière (manchons périvasculaires et infiltration par des cellules inflammatoires, prolifération et nécrose endothéliale, et formation de thrombus).

2. Épreuves sérologiques

En raison de l'ubiquité des agents viraux responsables de la rhinopneumonie et de la forte prévalence parmi les chevaux dans la plupart des régions du monde, la détection d'un titre en anticorps négatif envers les EHV-1/4 par des dosages sérologiques chez des chevaux destinés à l'exportation n'est pas reprise dans les règlements vétérinaires qui visent à prévenir la dispersion internationale des maladies infectieuses des chevaux. Les épreuves sérologiques peuvent, cependant, être une procédure complémentaire utile pour assister le diagnostic de la rhinopneumonie chez les chevaux. Le diagnostic sérologique de la rhinopneumonie est basé sur la démonstration d'une augmentation significative du titre en anticorps dans des sérums couplés, pris durant la phase aiguë et la période de convalescence de la maladie. Les résultats des épreuves réalisées sur sérum provenant d'une seule collecte, dans la plupart des cas, sont impossibles à interpréter avec un niveau de confiance satisfaisant. L'échantillon de sérum initial (phase aiguë) doit être prélevé aussi tôt que possible après le début des signes cliniques, et le second (période de convalescence) doit être pris 2 à 4 semaines plus tard. Des sérums (phase aiguë) de juments après avortement ou de chevaux avec une encéphalite à l'EHV-1 peuvent déjà contenir un titre maximal en anticorps contre l'EHV-1, avec aucune augmentation détectable du titre dans les sérums récoltés à des dates ultérieures. Dans de tels cas, les sérologies couplées à partir d'échantillons pris sur des membres du troupeau non affectés cliniquement pour repérer une augmentation du titre en anticorps contre les EHV-1/4 peut fournir une information utile pour un diagnostic rétrospectif de rhinopneumonie dans le troupeau. Enfin, la détection sérologique d'anticorps contre l'EHV-1 dans le sang cardiaque ou ombilical ou d'autres liquides de fœtus équin peut avoir une valeur diagnostique pour l'EHV-1 dans de rares cas où les avortons sont virologiquement négatifs ; dans certains cas il est possible de mettre en évidence le génome des virus EHV 1/4 par PCR.

Le titre en anticorps sériques contre les EHV-1/4 peut être déterminé par ELISA (8), séroneutralisation (SN) (15), ou un test de fixation du complément (FC) (15). Comme il n'y pas de réactifs reconnus internationalement ou de techniques normalisées pour réaliser les épreuves de diagnostic sérologique pour la détection d'anticorps contre les EHV-1/4, les déterminations des titres en anticorps sur le même sérum peuvent différer d'un laboratoire à l'autre. Par ailleurs, toutes les épreuves sérologiques mentionnées détectent les anticorps qui ont une réactivité croisée entre l'EHV-1 et l'EHV-4. Néanmoins, la démonstration, par ces épreuves, d'une augmentation du titre en anticorps de 4 fois ou plus durant le cours de la maladie fournit la confirmation sérologique d'une infection récente avec un des virus. Les tests de FC et l'ELISA ont l'avantage de fournir des résultats plus rapidement et de ne pas demander de culture cellulaire. Récemment, un ELISA type spécifique qui peut faire la distinction entre les anticorps contre l'EHV-1 et l'EHV-4 a été développé et est commercialement disponible (6). Le test de microneutralisation est une épreuve sérologique largement utilisée et sensible pour la détection des anticorps contre les EHV-1/4 et sera donc décrite ici.

a) Test de séroneutralisation du virus

Ce test sérologique est plus communément réalisé dans une plaque de microtitrage de 96 puits (culture de tissus calibrée) utilisant une dose constante de virus et des dilutions double des sérums équins à tester. Il faut au moins deux puits répétés pour chaque dilution de sérum. Du sérum sans MEM est utilisé comme diluant. Des stocks de virus de titre connu sont dilués juste avant l'utilisation pour contenir 100 DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) dans 25 µl. Des monocouches de cellules E-Derm ou RK-13 sont dispersées avec de l'EDTA/trypsine et resuspendues à une concentration de 5×10^5 /ml. Remarquez que les cellules RK-13 peuvent être utilisées avec l'EHV-1 mais ne donne pas un ECP clair avec l'EHV-4. Des sérums témoins équins positif et négatif en anticorps, des contrôles de viabilité des cellules, des contrôles d'infectivité du virus, et le test de cytotoxicité du sérum, doivent être inclus dans chaque épreuve. Enfin les titres de virus neutralisant les anticorps sont calculés en déterminant la réciproque de la plus haute dilution de sérum qui protège 100 % de la monocouche cellulaire de la destruction virale dans chacun des deux puits répétés.

Le protocole convenable du test est comme suit :

- i) Inactiver les sérums à tester et les sérums témoins en les plaçant 30 min dans un bain d'eau à 56 °C ;
- ii) Ajouter 25 µl de sérum sans MEM à tous les puits de la plaque de microtitrage ;
- iii) Pipeter 25 µl de chaque sérum test dans les puits dupliqués des deux rangées A et B de la plaque. La première rangée sert comme témoin de toxicité du sérum et la seconde rangée comme la première dilution du test. Faire des dilutions doubles de chaque sérum de départ avec la rangée B et en commençant du fond de la plaque par mélange séquentiel et transfert de 25 µl à chaque rangée de puits suivante. Six sérums peuvent être testés dans chaque plaque ;
- iv) Ajouter 25 µl du stock de virus dilué d'EHV-1 ou d'EHV-4 à chaque puits (100 DICT₅₀/puits) excepté ceux des rangées A, qui sont les puits des sérums témoins pour la surveillance de la toxicité du sérum envers les cellules indicatrices. Remarquez que les dilutions finales de sérum, après addition de virus, tournent autour de 1/4 à 1/256 ;
- v) Une plaque témoin séparée doit inclure : le titrage des sérums de chevaux positifs et négatifs de titre connu, des cellules témoins (pas de virus), un virus témoin (pas de sérum) et un titrage viral pour calculer la quantité réel de virus utilisée dans le test ;
- vi) Incuber les plaques pendant 1 h à 37 °C dans une atmosphère de 5 % en CO₂ ;
- vii) Ajouter 50 µl de la suspension préparée de cellules E-Derm ou RK-13 (5×10^5 cellules/ml) dans du MEM 10 % contenant du sérum fœtal de veau à chaque puits ;
- viii) Incuber les plaques pendant 4 à 5 jours à 37 °C en atmosphère de 5 % de CO₂ ;
- ix) Examiner l'ECP sur les plaques au microscope et enregistrer les résultats sur une feuille de travail. Alternativement, la monocouche cellulaire peut être cotée pour son ECP après fixation et coloration comme suit : après retrait du milieu de culture, immerger la plaque pendant 15 min dans une solution contenant 2 mg/ml de crystal violet, 10 % de formol, 45 % de méthanol, et 45 % d'eau. Ensuite, rincer les plaques vigoureusement sous un jet d'eau du robinet ;
- x) Les puits contenant une monocouche cellulaire intacte sont colorés en bleu, alors que les monocouches détruites par le virus ne sont pas colorées. Vérifier que les cellules témoins, le sérum témoin positif, et le contrôle de la cytotoxicité du sérum soient colorés en bleu, que le virus témoin et le sérum témoin négatif ne soient pas colorés, et que la quantité réel de virus ajoutée à chaque puits est entre $10^{1,5}$ et $10^{2,5}$ DICT₅₀. Les puits sont notés comme positifs à la neutralisation du virus si 100 % de

la monocouche cellulaire reste intacte. La plus haute dilution de sérum résultant en une neutralisation complète du virus (pas d'ECP) dans les deux puits répliqués est le titre dilution-finale pour ce sérum ;

- xi) Calculer le titre neutralisant pour chaque sérum testé, et comparer les titres de la phase aiguë et de convalescence pour chaque animal. L'animal est considéré positif quand on observe une augmentation de 4 fois ou plus du titre.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Des vaccins atténués et inactivés sont disponibles. Ils sont préparés, commercialisés et utilisés comme aide prophylactique car ils permettent de réduire la charge de la maladie chez les chevaux infectés par les EHV-1/4. L'expérience clinique a démontré qu'il ne faut compter sur aucune des préparations vaccinales pour fournir un degré absolu de protection contre la rhinopneumonie. Des doses multiples, répétées annuellement, de chacun des vaccins rhinopneumonie actuellement commercialisés sont recommandées par leur fabricant respectif, avec des programmes de vaccination qui varient selon la particularité du vaccin.

Les directives pour la production de vaccin vétérinaire sont données dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les directives données ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont de nature générales et peuvent être supplémentées par des directives nationale et régionale.

Au moins 16 vaccins contre la rhinopneumonie sont actuellement commercialisés par 5 fabricants, chacun contenant des permutations de l'EHV-1, l'EHV-4, et des deux sous-types du virus influenza équin.

Les indications cliniques formulées sur l'étiquette des vaccins rhinopneumonie disponibles sont les maladies respiratoires associées aux herpèsvirus, l'avortement, ou les deux. Seulement 4 vaccins produits ont satisfait aux conditions réglementaires d'efficacité requise en fournissant une protection contre les avortements dus à l'herpèsvirus dans des expériences de vaccination et d'inoculation de juments gestantes. Aucun des vaccins produits n'a démontré de façon définitive sa capacité à prévenir l'occurrence de maladie neurologique parfois associée avec une infection à l'EHV-1.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Le lot de semence primaire des virus (MSV) pour les vaccins rhinopneumonie doit être préparé à partir de souches de l'EHV-1 et/ou de l'EHV-4 qui ont été positivement et sans équivoque identifiées par des épreuves sérologique et génétique. Le lot de semence du virus doit être propagé dans une lignée cellulaire approuvée dans la production de vaccin équin par une agence de contrôle appropriée. Un enregistrement complet de la source d'origine, histoire des passages, milieu utilisé pour la propagation, etc., doit être gardé pour la préparation des lots de semence primaire des virus et des stocks cellulaires voulus pour leur utilisation dans la production de vaccin. Régulièrement, les stocks emmagasinés de MSV et de lot de semence primaire des cellules (MCS) utilisés pour la production de vaccin doivent être testés pour leur pureté et leur innocuité. Dans le cas des MSV, l'immunogénicité est aussi contrôlée. Généralement, le cinquième passage à partir de MSV et le vingtième passage à partir des MCS sont considérés comme les plus élevés prévus pour la production de vaccin. Les résultats de tous ces tests de contrôle de qualité sur les lots de semence primaire doivent être enregistrés et faire partie des données présentes dans les dossiers d'enregistrement.

b) Validation comme vaccin

i) Pureté

Les tests pour la pureté des lots de semence primaire comprennent des procédures prescrites qui démontrent que les stocks de lots de virus et de cellules ne contiennent pas de bactéries, de champignons, de mycoplasmes, et de virus étrangers. Des tests spéciaux doivent être réalisés pour confirmer l'absence d'artérovirus, du virus de l'anémie infectieuse équine, de l'influenza équin, d'herpèsvirus équin -2, -3, et -5, du rhinovirus équin, des alphavirus des encéphalomyélites équines, du virus de la maladie des muqueuses bovine (BVDV – contaminant fréquent des sérums bovins), et du parvovirus porcin (PPV – contaminant potentiel de la trypsine porcine). La vérification de la pureté doit aussi inclure l'exclusion de la présence de l'EHV-1 dans les lots de semence primaire du virus de l'EHV-4 et vice-versa.

ii) *Innocuité*

L'innocuité de chaque lot de MSV doit être testée chez des chevaux considérés comme sensibles au virus sauvage virulent, incluant les juments gestantes dans les 4 derniers mois de gestation, avant que les lots ne soient utilisés dans la préparation de vaccin vivant atténué contre la rhinopneumonie. L'innocuité du vaccin doit être démontrée par un test d'innocuité sur le terrain chez des chevaux d'âges différents provenant de 3 régions géographiques différentes. Les tests d'innocuité devraient être conduits par des vétérinaires indépendants utilisant un lot pré commercial de vaccin. L'innocuité des vaccins contre l'EHV-1 possédant une indication de protection envers l'avortement doit être testée sur un nombre significatif de juments gestantes en fin de gestation, utilisant le programme de vaccination qui sera recommandé par le fabricant pour le vaccin final.

iii) *Immunogénicité*

Les tests d'immunogénicité des stocks de MSV des EHV-1/4 doivent être réalisés sur des chevaux avec un vaccin expérimental préparé à partir du nombre de passage le plus élevé autorisé pour la production du vaccin. L'épreuve pour l'immunogénicité des MSV consiste en une vaccination des chevaux possédant un titre bas en anticorps contre les EHV-1/4, avec des doses de vaccin test qui seront recommandées dans le produit final étiqueté. Les seconds échantillons de sérum devraient être obtenus et testés pour la recherche d'une augmentation significative du titre en anticorps neutralisant contre le virus, 21 jours après la dernière injection.

iv) *Efficacité*

Une part importante de la procédure de validation est la capacité d'un lot de vaccin pré commercial contre la rhinopneumonie à fournir un niveau significatif de protection clinique envers les manifestations particulières de la maladie causée par une infection par les EHV-1/4 chez les chevaux, quand il est utilisé selon les conditions recommandées par le fabricant. Les données sérologiques ne sont pas acceptables pour établir l'efficacité des vaccins contre la rhinopneumonie. Les études d'efficacité doivent être conduites pour assurer une distribution aléatoire des animaux testés au sein du groupe, l'enregistrement des observations cliniques en aveugle, et l'utilisation d'un nombre suffisant d'animaux pour permettre l'évaluation statistique de l'efficacité dans la prévention ou la réduction de la maladie clinique spécifiée. Les études devraient être réalisées sur des vaccins expérimentaux entièrement formulés et (a) produits conformément à, (b) ayant le minimum (ou moins) d'activité antigénique spécifiée dans, et (c) produit avec le passage le plus élevé de MSV et de MCS permis par le « Guide de fabrication » approuvé (voir section C.2). L'efficacité du vaccin est démontrée par la vaccination d'un minimum de 20 chevaux sensibles aux EHV-1/4 possédant un titre en anticorps neutralisants ≤ 32 , suivi par une épreuve virulente sur des chevaux vaccinés et sur 10 chevaux témoin non vaccinés. L'étude de la vaccination et de l'épreuve virulente doit être réalisée sur un nombre identique de juments gestantes et évaluée en fonction de l'avortement si le vaccin est destiné à la prévention à l'aide dans la prévention des avortements causés par L'EHV- 1.

2. Méthode de fabrication

Un protocole détaillé des méthodes de fabrication suivies doit être respecté pour la préparation des vaccins contre la RE. Il est approuvé, et classé comme guide de fabrication par l'agence de médicament appropriée. La spécificité des méthodes de fabrication des vaccins rhinopneumonie diffèrera avec le type (vivant ou inactivé) et la composition (EHV-1 seulement, EHV-4 et EHV-1, EHV-4 et le virus influenza équin, etc.) de chaque produit individuel, et aussi avec le fabricant.

3. Contrôles en cours de fabrication

Les cellules, les virus, le milieu de culture, et les suppléments d'origine animale ajoutés au milieu qui sont utilisés pour la production des lots de vaccins doivent être dérivés de stocks importants qui ont passé les tests prescrits en ce qui concerne la stérilité bactérienne, fongique, et l'absence de mycoplasme ; l'absence d'effet cancérigène ; et l'absence d'agent viraux extérieurs.

4. Contrôle des lots

Chaque lot de vaccin RE doit passer les tests de stérilité, d'innocuité, et d'activité immunogénique.

a) *Stérilité*

Des échantillons pris dans chaque lot de vaccin complet sont testés pour les contaminations par des bactéries, des champignons, et des mycoplasmes. Les procédures pour établir que le vaccin ne contient pas de virus étrangers sont aussi requises ; de tels tests doivent inclure l'inoculation d'une culture de cellules permettant la détection de virus équins communs, et aussi des techniques pour la détection du BVDV et du PPV dans les ingrédients d'origine animale utilisés dans la production des lots de vaccins.

b) Innocuité

Des tests pour assurer l'innocuité de chaque lot de vaccin RE doivent démontrer une inactivation complète du virus (pour les vaccins inactivés) ainsi qu'un niveau résiduel d'agent tuant les virus qui ne peut pas excéder la limite maximale permise (ex. 0,2 % pour le formol). Des tests d'innocuité sur des animaux de laboratoire sont aussi requis.

c) Activité

Le contrôle par lots de l'activité antigénique des vaccins contre l'EHV-1 peut être testé seulement en mesurant la capacité de différentes dilutions de vaccin à protéger des hamsters d'une infection avec une dose létale d'EHV-1 adapté au hamster. Cependant les tests d'activité sur la production en masse de vaccin RE peuvent aussi être réalisés par vaccination de chevaux sensibles suivie soit par une infection virale ou soit par un test de séroconversion. La disponibilité récente d'AcMs spécifiques du virus a permis le développement d'épreuves immunologiques *in vitro* moins coûteuses et plus rapides pour déterminer l'activité antigénique. La base pour de telles épreuves *in vitro* pour évaluer l'activité des vaccins contre la RE est la détermination, grâce à des AcMs spécifiques, de la présence dans chaque lot de vaccin d'antigène viral en quantité supérieure au minimum correspondant au niveau requis de protection (ou du taux de séroconversion) au cours d'un test d'activité.

d) Durée de l'immunité

Des tests pour établir la durée de l'immunité envers les EHV-1/4 obtenue par immunisation ne sont pas exigés pour chaque lot de vaccin. Les résultats de nombreuses observations rapportées indiquent que l'immunité induite par la vaccination envers les EHV-1/4 n'excède pas quelques mois ; ces observations sont reflétées par la fréquence de revaccination recommandée par la notice des vaccins RE.

e) Stabilité

Au moins 3 lots de vaccin doivent être testés pour la durée de conservation avant d'obtenir une conclusion sur la stabilité du vaccin. Lorsqu'ils sont stockés à 4 °C, les vaccins inactivés produits couramment conservent leur activité antigénique d'origine pendant au moins 1 an. Des préparations lyophilisées de vaccin vivant sont aussi stables durant 1 an quand elles sont stockées à 4 °C. Après reconstitution, les vaccins vivants ne sont pas stables et ne peuvent pas être stockés sans perte d'activité.

5. Contrôles du produit fini

Avant la délivrance pour l'étiquetage, l'emballage et la distribution commerciale, des fioles de produits vaccinaux finaux sélectionnées au hasard doivent être testées par des méthodes prescrites pour l'absence de contamination et la sécurité chez des animaux de laboratoire.

a) Innocuité

(Voir section C.4.b)

b) Activité

(Voir section C.4.c)

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALLEN G.P. & BRYANS J.T. (1986). Molecular epidemiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *In: Progress in Veterinary Microbiology and Immunology*, Vol. 2, Pandey R., ed. Karger, Basel, Switzerland & New York, USA, 78–144.
2. ALLEN G.P., KYDD J.H., SLATER J.D. & SMITH K.C. (1999). Recent advances in understanding the pathogenesis, epidemiology, and immunological control of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion. *Equine Infect. Dis.*, **8**, 129–146.
3. ALLEN G.P., KYDD J.H., SLATER J.D. & SMITH K.C. (2004). Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. *In: Infectious Diseases of Livestock*, Coetzer J.A.W., Thomson G.R. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, South Africa.
4. BORCHERS K. & SLATER J. (1993). A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J. Virol. Methods*, **45**, 331–336.

5. BRYANS J.T. & ALLEN G.P. (1988). Herpesviral diseases of the horse. *In: Herpesvirus Diseases of Animals*, Wittman G., ed. Kluwer, Boston, USA, 176–229.
6. CRABB B.S., MACPHERSON C.M., REUBEL G.H., BROWNING G.F., STUDDERT M.J. & DRUMMER H.E. (1995). A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. *Arch. Virol.*, **140**, 245–258.
7. CRABB B.S. & STUDDERT M.J. (1995). Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Adv. Virus Res.*, **45**, 153–190.
8. DUTTA S.K., TALBOT N.C. & MYRUP A.C. (1983). Detection of equine herpesvirus-1 antigen and the specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 1930–1934.
9. GUNN H.M. (1992). A direct fluorescent antibody technique to diagnose abortion caused by equine herpesvirus. *Irish Vet. J.*, **44**, 37–40.
10. LAWRENCE G.L., GILKERSON J., LOVE D.N., SABINE M. & WHALLEY J.M. (1994). Rapid, single-step differentiation of equid herpesvirus 1 and 4 from clinical material using the polymerase chain reaction and virus-specific primers. *J. Virol. Methods*, **47**, 59–72.
11. O'KEEFE J.S., JULIAN A., MORIARTY K., MURRAY A. & WILKS C.R. (1994). A comparison of the polymerase chain reaction with standard laboratory methods for the detection of EHV-1 and EHV-4 in archival tissue samples. *N.Z. Vet. J.*, **42**, 93–96.
12. SCHULTHEISS P.C., COLLINS J.K. & CARMAN J. (1993). Use of an immunoperoxidase technique to detect equine herpesvirus-1 antigen in formalin-fixed paraffin-embedded equine fetal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **5**, 12–15.
13. TELFORD E.A.R., WATSON M.S., MCBRIDE K. & DAVISON A.J. (1992). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology*, **189**, 304–316.
14. TELFORD E.A.R., WATSON M.S., PERRY J., CULLINANE A.A. & DAVISON A.J. (1998). The DNA sequence of equine herpesvirus 4. *J. Gen. Virol.*, **79**, 1197–1203.
15. THOMSON G.R., MUMFORD J.A., CAMPBELL J., GRIFFITHS L. & CLAPHAM P. (1976). Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Vet. J.*, **8**, 58–65.
16. VAN MAANEN C., VREESWIJK J., MOONEN P., BRINKHOF J. DE BOER-LUIJTZE E. & TERPSTRA C. (2000). Differentiation and genomic and antigenic variation among fetal, respiratory, and neurological isolates from EHV1 and EHV4 infections in The Netherlands. *Vet. Q.*, **22** (2): 88–93.
17. VARRASSO A., DYNON K., FICORILLI N., HARTLEY C.A., STUDDERT M.J. & DRUMMER H.E. (2001). Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.*, **79**, 563–569.
18. WAGNER W.N., BOGDAN J., HAINES D., TOWNSEND H.G.G. & MISRA V. (1992). Detection of equine herpesvirus and differentiation of equine herpesvirus type 1 from type 4 by the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.*, **38**, 1193–1196.
19. WELCH H.M., BRIDGES C.G., LYON A.M., GRIFFITHS L. & EDINGTON N. (1992). Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and cocultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.*, **73**, 261–268.
20. WHITWELL K.E., GOWER S.M. & SMITH K.C. (1992). An immunoperoxidase method applied to the diagnosis of equine herpesvirus abortion, using conventional and rapid microwave techniques. *Equine Vet. J.*, **24**, 10–12.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la rhinopneumonie équine (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).

ARTÉRITE VIRALE ÉQUINE

RÉSUMÉ

L'artérite virale équine (AVE) est une maladie virale contagieuse des équidés causée par le virus de l'artérite équine (VAE), virus à ARN classé dans la famille des Artérviridés. Actuellement, un seul sérotype du virus de l'AVE a été identifié ; ce virus est présent dans les populations de chevaux de nombreux pays dans le monde. Bien que peu fréquents dans le passé, le nombre de foyers du VAE semble en augmentation.

La majeure partie des infections causées par le VAE est subclinique. Lorsqu'ils sont présents les signes cliniques peuvent varier en forme et en sévérité. La maladie se caractérise principalement par de la fièvre, de l'anorexie, un œdème variable plus particulièrement des membres, du scrotum et du prépuce chez l'étalon, de la conjonctivite, une réaction cutanée de type urticariale, des avortements et rarement par une pneumonie fulgurante, une entérite ou une pneumo-entérite chez le poulain. En dehors de la mortalité chez les poulains le pourcentage de cas mortels dans un foyer est très réduit. Les chevaux affectés par la maladie guérissent complètement dans la quasi-totalité des cas. Un portage prolongé peut survenir chez nombre variable d'étalons infectés, mais ni chez les juments, ni chez les hongres, ni chez les poulains sexuellement immatures.

Identification de l'agent pathogène : *l'AVE ne peut être différenciée de nombreuses autres maladies équinés respiratoires ou systémiques. Le diagnostic de l'AVE repose sur l'isolement viral, la détection de l'antigène viral ou de son acide nucléique, ou la mise en évidence d'anticorps spécifiques. Les essais d'isolement viral doivent être effectués à partir d'échantillons appropriés prélevés en fonction des signes cliniques ou post mortem et inoculés à des cultures cellulaires de lapin, de cheval ou de rein de singe. L'identification des isolats de VAE doit être confirmée par une épreuve de séroneutralisation virale, la technique de transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) ou par des méthodes immunocytochimiques, essentiellement l'immunofluorescence indirecte ou les techniques avidine-biotine-peroxydase (ABP).*

La détection et l'identification de l'acide nucléique du VAE dans les cas suspects peuvent aussi être effectuées en ayant recours à la technique RT-PCR utilisant des amorces spécifiques de l'ARN viral appropriées.

Lorsque la mortalité est associée à un cas suspect d'AVE, un échantillonnage large de tissus doit être examiné en histologie pour recherche d'une panvasculite, particulièrement prononcée dans toutes les petites artères. Les lésions vasculaires caractéristiques de l'adulte ne sont pas un élément particulier des avortements dus au VAE. Dans ces cas, les antigènes de l'AVE peuvent être visualisés par examen immunohistochimique du placenta ou de divers tissus fœtaux.

Épreuves sérologiques : *une large variété d'épreuves, tels que la séroneutralisation (SN) la fixation du complément (FC), l'immunofluorescence indirecte, l'immunodiffusion en gel, les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) et l'épreuve des microbilles fluorescentes (MBF) a été utilisée pour la détection des anticorps anti-VAE. Les épreuves les plus couramment utilisées sont les épreuves de SN en présence de complément et les épreuves ELISA. L'épreuve de SN est une épreuve très sensible et hautement spécifique dont la valeur a été démontrée dans le diagnostic des infections aiguës et les études de séroprévalence. Plusieurs ELISAs ont été développés, mais aucun d'entre eux n'a fait l'objet d'une validation comme ce fut le cas pour l'épreuve de SN bien qu'ils semblent comparables en spécificité et qu'ils présentent une sensibilité presque identique. Le test de FC est moins sensible, mais peut être utilisé comme moyen de diagnostic en cas d'infection récente.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : deux vaccins commerciaux produits en culture cellulaire sont couramment disponibles contre l'AVE. Le premier est un vaccin vivant atténué préparé à partir de virus atténué pour le cheval par de multiples passages en série sur des cultures de cellules de première explantation de cheval et de lapin. Il s'est révélé sans danger et protecteur pour les étalons et les juments non-gestantes. La vaccination des poulains de moins de 6 semaines et des juments dans les deux derniers mois de gestation est contre-indiquée. Il n'y a pas de preuve de reversion de virulence du virus utilisé dans le vaccin suite à son utilisation sur le terrain depuis plus de 20 ans. Le second vaccin est un vaccin inactivé adjuvé produit à partir d'un virus cultivé sur cultures cellulaires équines, pouvant être utilisé pour les chevaux à la reproduction ou non. En l'absence de données suffisantes sur son innocuité ce vaccin n'est pas recommandé chez les juments gestantes.

A. INTRODUCTION

L'artérite virale équine (AVE) est une maladie virale contagieuse des équidés causée par le virus de l'artérite équine qui est un virus ARN de sens positif, simple brin et le prototype du genre *Arterivirus*, famille des *Arteriviridae* de l'ordre des *Nidovirus* (10). La lymphangite épizootique « *Pink Eye* » (Œil rose), la fièvre typhoïde et le rotlaufseuche sont quelques termes descriptifs utilisés dans le passé faisant référence à des maladies très proches cliniquement de l'AVE. L'hôte naturel du VAE apparaît restreint aux équidés, bien que quelques arguments laissent à penser que la maladie pourrait aussi toucher les camélidés du Nouveau Monde, comme les alpagas et les lamas (63). Le virus ne représente pas un danger pour la santé humaine (59). Le virus de l'AVE est présent dans la plupart des populations de chevaux dans le monde (59). L'incidence de l'AVE est en augmentation depuis quelques années, augmentation qui a été associée à la fréquence accrue des mouvements d'animaux et des transports de sperme (2, 59).

Bien que la majorité des cas d'AVE soient subcliniques certaines souches de virus peuvent entraîner une maladie de gravité variable (59). Les cas typiques d'AVE peuvent présenter toutes les combinaisons des signes suivants : fièvre, abattement, anorexie, leucopénie, œdème variable particulièrement des membres, du scrotum et du prépuce chez l'étalon, conjonctivite, suppuration oculaire, œdème supra et péri-orbital, rhinite, jetage, réaction cutanée urticaire générale ou locale, avortement, mortinatalité et de façon rare pneumonie fulgurante, entérite ou pneumo-entérite chez les jeunes poulains. Quelle que soit la sévérité des signes cliniques, les chevaux affectés récupèrent complètement de façon presque constante. La fréquence des cas mortels est très rare dans les foyers d'AVE, la mortalité ne se rencontre généralement que sur les très jeunes poulains, notamment en cas d'infection congénitale (37, 59, 62), et très rarement chez les chevaux adultes.

L'AVE ne peut être différenciée cliniquement de nombreuses autres maladies équines respiratoires ou systémiques dont les plus fréquentes sont la grippe équine, les infections à herpes virus équin 1 et 4, les infections par les rhinovirus équins A et B, les infections à adénovirus équin et les infections streptococciques en particulier le purpura hémorragique. La maladie a aussi quelques points communs avec l'anémie infectieuse, avec des cas d'infection par les virus de Getah ou Hendra, avec les intoxications causées par l'Alysson blanchâtre (*Berteroa incana*). Après contamination, le VAE se multiplie dans les macrophages et les monocytes circulants (18) et est excrété dans diverses sécrétions ou excréments des animaux faisant une infection aiguë, et notamment en grande quantité à partir de l'appareil respiratoire (42)

Un pourcentage variable des étalons ayant fait une infection aiguë peuvent devenir ultérieurement des porteurs chroniques du virus au niveau de l'appareil reproducteur et excréteur permanents par le sperme (59, 60). Le portage dont il a été démontré qu'il était dépendant des hormones mâles, n'a été retrouvé que chez l'étalon mais pas chez la jument, le cheval hongre ou le poulain prepubère (59). La preuve irréfutable de l'état de portage chronique n'a été apportée que chez les étalons possédant des anticorps dirigés contre le virus de l'AVE (60). Bien qu'une baisse temporaire du taux de testostérone dans le sang (soit par l'utilisation d'un antagoniste de la GnRH ou par immunisation avec la GnRH) semble hâter la disparition de l'état de portage chronique chez certains étalons, l'efficacité de l'une ou l'autre stratégie doit encore être pleinement vérifiée. Le risque que ces approches thérapeutiques puissent être employées pour masquer délibérément l'état de portage soulève des inquiétudes.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

a) Isolement viral

En cas de suspicion d'un foyer d'AVE ou pour confirmation de cas subcliniques d'infection par le VAE l'isolement viral doit être tenté à partir d'écouvillonnages nasaux ou de la conjonctive, de prélèvements de sang complet sur anticoagulant et du sperme des étalons suspects d'être porteurs de virus (59). Pour optimiser les chances d'isolement du virus, les prélèvements doivent être effectués aussitôt que possible après la poussée thermique. Il a été démontré que l'héparine peut inhiber la multiplication du virus sur cellules de rein de lapin (RK-13) (1) et, par conséquent, son utilisation comme anticoagulant n'est pas indiquée, car elle peut interférer avec l'isolement du virus à partir du sang complet. Le dextrose-citrate acide ou l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) sont les anticoagulants recommandés. En cas de suspicion d'AVE chez le poulain ou chez des animaux plus âgés, l'isolement du virus peut être tenté à partir d'une grande diversité de tissus notamment les nœuds lymphatiques et organes de l'appareil digestif des poumons du foie et de la rate (42). Dans les foyers d'avortement ou de mortinatalité dus à l'AVE le placenta, les fluides fœtaux et divers tissus fœtaux lymphoréticulaires ou autres (en particulier les poumons) peuvent être des sources de virus (59).

Les écouvillons pour isolement de virus doivent être immergés dans un milieu de transport approprié pour les virus, ainsi que les fluides ou tissus qui sont collectés dans le même temps pour isolement viral et/ou la technique de transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR). Ils doivent être expédiés au laboratoire si possible dans les 12 h, soit réfrigérés, soit congelés, dans un emballage protégé. Les prélèvements de sang complet doivent être transportés réfrigérés mais non congelés. Autant que faire se peut, il convient d'adresser les échantillons à des laboratoires compétents pour le diagnostic de cette infection.

Bien qu'avec des succès inconstants lors de cas d'infection naturelle par l'AVE (43, 59), l'isolement du virus à partir d'échantillons cliniques ou de tissus récoltés *post mortem* doit être effectué sur cultures cellulaires de rein de lapin, de cheval ou de singe (43, 57, 59). Des lignées cellulaires telles que les lignées RK-13 (ATCC CCL-37), LLC MK2 (ATCC CCL-7) ou les cultures de cellules de première explantation de rein de cheval ou de lapin peuvent être utilisées, mais les cellules RK-13 semblent le système de choix (57). L'expérience acquise au cours des années a montré qu'il est plus difficile d'isoler le virus de l'AVE à partir du sperme que des autres échantillons ou des tissus infectés sauf si un système cellulaire approprié est utilisé. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'isolement en premier passage sur RK-13 du virus à partir du sperme (49). Les isollements ont un meilleur rendement en utilisant des cultures monocouches de 3 à 5 jours, un large inoculum par rapport à la surface d'inoculation en flacon ou sur plaques multipuits et, le plus important, en incorporant de la carboxy-méthyle cellulose dans le milieu de culture (viscosité du milieu : 400-800 cps). Il est à noter que la plupart des cultures de cellules RK-13 provenant de l'ATCC CCL-37 sont contaminées par le virus de la maladie des muqueuses, dont la présence semble stimuler la sensibilité du système cellulaire au premier passage pour isolement du virus de l'AVE, notamment à partir du sperme. Il paraît prouvé que les chances d'isolement en premier passage de l'AVE sont plus fortes avec des cultures de cellules RK-13 ayant un nombre de passages important¹ (57).

Les cultures cellulaires inoculées doivent être examinées quotidiennement pour rechercher un effet cytopathogène (ECP) qui apparaît habituellement entre 2 et 6 jours. En absence d'ECP visible les surnageant de culture doivent être inoculés de nouveau sur des cultures confluentes de cellules au bout de 4 à 7 jours. Alors que la plupart des isollements sont obtenus au premier passage en culture, l'isolement d'une petite fraction n'est visible que lors du deuxième passage (ou plus) *in vitro* (59, 60). L'identification des isolats de VAE peut être réalisée par séroneutralisation directe (SN), par RT-PCR classique ou RT-PCR en temps réel (2, 12, 51, 53), par une méthode immunocytochimique (36) principalement l'immuno-fluorescence indirecte (16) ou par la technique avidine-biotine-peroxydase (ABP) (36). Un sérum polyclonal de lapin a été utilisé pour identifier le virus de l'AVE en culture cellulaire. Des anticorps monoclonaux murins (AcMs) dirigés contre la nucléocapside (N) (2, 40) ou la glycoprotéine majeure d'enveloppe (GP5) (2, 17), ainsi qu'un sérum de lapin mono-spécifique contre la protéine non-glycosylée d'enveloppe (M) (2, 39, 40) ont également été proposés et peuvent détecter les diverses souches du virus sur cellules RK-13 dès 12 à 24 h après inoculation (2, 36).

¹ Une telle lignée cellulaire (RK-13-KY) est disponible auprès du Dr. P.J. Timoney, Maxwell H. Gluck Equine Research Center, Université du Kentucky, Lexington, Kentucky 40546-0099, États Unis d'Amérique (adresse électronique : ptimoney@uky.edu).

- **Isolement du virus à partir du sperme (Épreuve prescrite pour les échanges internationaux)**

Il est largement démontré que les étalons porteurs du virus à court ou long terme excrètent le virus de l'AVE de façon constante dans le sperme, mais pas dans les sécrétions respiratoires ni dans l'urine ; la présence de virus n'a pas non plus été démontrée dans les cellules blanches du sang de ces animaux (59, 60). Le sang de ces étalons doit au préalable être testé par une épreuve de séroneutralisation (SN), une épreuve immuno-enzymatique validée de manière appropriée (ELISA) ou toute autre épreuve sérologique. L'isolement du virus doit être fait à partir du sperme d'étalons trouvés positifs (titre $\geq 1/4$) par recherche des anticorps anti-virus de l'AVE. Le sperme doit en outre provenir d'étalons non vaccinés ou vaccinés mais avec la confirmation que leur sérologie était alors initialement négative (titre $\leq 1/4$). L'isolement du virus est aussi indiqué en cas d'envoi de sperme lorsque l'on ne connaît pas le statut sérologique ni l'historique d'une éventuelle vaccination du donneur. Il est recommandé de procéder à deux recherches de virus sur des prélèvements différents effectués le même jour ou à quelques jours ou semaines d'intervalle. Il n'y a aucune preuve que les isollements de virus sur certains étalons puissent dépendre de la fréquence ou de l'intervalle entre les prélèvements ou de la période de l'année. L'isolement du virus doit être tenté autant que possible à partir d'un éjaculat entier recueilli sur vagin artificiel à l'aide d'un préservatif et d'un mannequin ou d'une jument souffeuse. Lorsqu'il n'est pas possible de recueillir du sperme de cette façon un procédé alternatif est de prélever un échantillon de sperme à l'occasion d'une saillie. Il est nécessaire de prendre des précautions lors du nettoyage des parties génitales externes de l'étalon et de s'assurer qu'il n'est pas utilisé d'antiseptiques ni de désinfectants. Les prélèvements doivent contenir la partie de l'éjaculat riche en sperme à laquelle le virus de l'AVE est associé, le virus n'est en effet pas présent dans la partie pré-éjaculatoire du sperme (59, 60). Immédiatement après avoir été recueilli le sperme doit être réfrigéré sur de la glace pilée ou sur des poches réfrigérées destinées au transport à destination immédiate du laboratoire. En cas de risque de retard avant mise en route des examens de laboratoire le sperme peut être refroidi à température égale ou inférieure à -20°C pour une courte durée avant envoi. Il ne semble pas que la congélation diminue les chances d'isolement du virus à partir du sperme d'un étalon porteur. Lorsque le statut de portage d'un étalon ne peut pas être déterminé par isolement du virus ou par RT-PCR, il est possible de lui faire saillir deux juments séro-négatives puis de tester celles-ci pour l'apparition d'anticorps 28 jours après la saillie (59).

- **Protocole**

- À l'arrivée au laboratoire, il convient de noter si les prélèvements de sperme sont congelés, refroidis ou à température ambiante. Chaque échantillon doit être vérifié pour s'assurer qu'il contient la fraction de l'éjaculat riche en sperme. Il est possible de le vérifier en examinant au microscope une fraction de l'échantillon entre lame et lamelle. En outre, il convient de contrôler visuellement les éjaculats pour la couleur et l'absence de grosses particules de contamination. Si l'échantillon est contaminé par du sang, ce qui peut survenir lors d'un traumatisme de l'appareil génital de l'étalon au moment de la collecte, un nouvel échantillon doit être demandé car l'isolement du virus peut être compromis lorsque l'échantillon provient d'un étalon séro-positif.
- Bien que cela ne soit plus considéré comme essentiel, le traitement préalable avant inoculation aux cultures cellulaires des échantillons par une courte sonication (3 cycles de 15 s) améliore le mélange et la dispersion de l'échantillon.
- Après rejet du milieu de culture, des cultures en couches monocellulaires confluentes de 3 à 5 jours de cellules RK-13, cultivées soit en flacons de 25 cm^2 de surface soit dans des plaques multipuits, sont inoculées avec des séries de dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-3}) de plasma séminal. Effectuées dans du milieu de culture contenant 2 % de sérum de veau fœtal et des antibiotiques l'inoculum doit être de 1 ml par flacon de 25 cm^2 de surface et ne doit pas être inférieur à deux flacons par dilution de l'échantillon de plasma séminal. Le volume de l'inoculum et le nombre de puits inoculés par dilution doivent être calculés lorsqu'on utilise des plaques multipuits. Une dilution appropriée de sperme témoin positif ou de virus témoin de titre connu doit être incluse dans chaque test ;
- Les flacons ou les plaques sont fermés ou couverts et délicatement agités afin de répartir l'inoculum sur les couches monocellulaires ;
- Les cellules inoculées sont alors incubées pendant 1 h à 37°C , soit en étuve conventionnelle, soit en étuve humide à 5 % de CO_2 dans l'atmosphère, suivant qu'on utilise des flacons ou des plaques multiples ;
- Sans enlever l'inoculum ni laver le tapis cellulaire, ces derniers sont recouverts de milieu de culture contenant des antibiotiques et 0,75 % de carboxy-méthyle cellulose ;
- Les flacons ou les plaques sont laissés à incuber à 37°C et examinés au microscope pour recherche d'ECP qui apparaît habituellement au bout de 2 à 6 jours ;
- En absence d'ECP visible, les surnageants de culture sont re-inoculés au bout de 5 à 7 jours à une culture de 3 à 5 jours de cellules RK-13. Après élimination du milieu de culture, les cellules sont fixées par le formol à 0,1 % et colorées au cristal violet.

L'identification de tout virus isolé doit être confirmée par séroneutralisation, par immunofluorescence (16) ou par une épreuve à l'avidine-biotine-peroxydase en utilisant un sérum monospécifique anti-virus de l'AVE ou des AcM dirigés contre les protéines structurales, N ou GP5 du virus (2, 18, 36, 37), ou encore par RT-PCR classique ou en temps (5, 38, 64).

Pour l'épreuve de séroneutralisation directe des dilutions décimales de l'isolat viral sont mises en présence d'un AcM neutralisant ou d'un antisérum monospécifique préparé contre la souche de référence de l'AVE *Bucyrus* (ATCC VR 796) et d'un sérum témoin dépourvu d'anticorps neutralisants vis-à-vis du virus. Des titrages en parallèle de la souche de référence *Bucyrus* avec les mêmes sérums de référence sont réalisés comme témoins. Le test s'effectue soit sur des façons de culture de 25 cm² de surface soit en microplaques. Des quantités appropriées des solutions d'anticorps positives et négatives de référence sont inactivées pendant 30 min au bain-marie à 56 °C et diluées au 1/4 dans du tampon phosphate pH 7,2 ; puis 0,3 ml d'anticorps dilué sont déposés dans 5 tubes pour chaque isolat de virus à identifier. Des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-5}) de chaque virus sont réalisées dans du milieu essentiel de Eagle contenant 10 % de sérum de veau fœtal des antibiotiques et 10 % de complément de cobaye fraîchement dilué. 0,3 ml de chaque dilution virale sont ensuite ajoutés aux tubes contenant les solutions d'anticorps de référence positifs et négatifs dilués. Les tubes sont ensuite agités et les mélanges virus anticorps mis à incuber pendant 1 h à 37 °C. Les mélanges virus anticorps sont ensuite inoculés à des cultures monocellulaires confluentes de cellules RK-13 de 3 à 5 jours soit en flacons de 25 cm² de surface soit dans des microplaques de culture cellulaire à raison de deux puits ou deux flacons par dilution de virus. Chaque flacon ou chaque puits est inoculé avec 0,25 ml de mélange virus-anticorps ; lors d'inoculation à des puits en microplaque la taille de l'inoculum est adaptée au support. Les plaques ou les flacons inoculés sont mis à incuber 2 h à 37 °C et agitées doucement au bout de 1 h, pour disperser l'inoculum sur la couche cellulaire. Sans rejeter l'inoculum ni laver le tapis cellulaire recouvrir celui-ci d'un milieu de culture contenant 0,75 % de carboxy-méthyle cellulose et incuber 4 à 5 jours à 37 °C soit en caisson anaérobie soit en étuve dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂. Après avoir rejeté le milieu, le tapis cellulaire est coloré par une solution tamponnée de cristal violet et de formol à 0,1 %. Les plaques de lyse sont comptées et le titre infectieux est calculé en présence et en absence d'anticorps anti AVE par la méthode de Searman-Karber (34). La confirmation de l'identification d'une souche de virus repose sur la comparaison des réductions de plages (au moins 10² log) en présence d'anticorps positif dirigés contre la souche de référence *Bucyrus* d'AVE.

La grande majorité des souches d'AVE isolées à partir des étalons porteurs le sont lors du premier passage en culture cellulaire selon le protocole du test décrit ci-dessus (59, 60). Le risque d'une cytotoxicité non due au virus ou provenant d'une contamination bactérienne des échantillons n'est pas considérée comme significatif lors des essais d'isolement de virus à partir du sperme des étalons. La cytotoxicité lorsqu'elle est observée, n'affecte habituellement que les tapis cellulaires inoculés avec des dilutions à 10^{-1} de plasma séminal et plus rarement avec des dilutions à 10^{-2} . Le traitement du plasma séminal par le polyéthylène glycol (PM 6000) avant inoculation a été utilisé avec quelque succès pour surmonter ce problème (25). La méthode décrite consiste à ajouter du polyéthylène glycol afin d'obtenir une concentration de 10 % de polyéthylène glycol à chaque dilution de plasma séminal de 10^{-1} à 10^{-3} . Les mélanges sont maintenus une nuit à 4 °C en agitation douce, puis ils sont centrifugés à 2 000 *g* pendant 30 min et le surnageant rejeté. Les précipités sont remis en suspension dans du milieu de culture, ajusté au 1/10 du volume initial et homogénéisé. Ces nouveaux mélanges sont centrifugés de nouveau à 2 000 *g* pendant 30 min, le surnageant de chaque mélange est alors prélevé et utilisé pour inoculation. Il ne semble pas que ce pré-traitement des plasmas séminaux nuise à la sensibilité de l'isolement du virus (25). Quand la contamination bactérienne pose problème, il est préférable de demander une nouvelle collecte de sperme de l'étalon. Lorsque cette nouvelle collecte n'est pas possible, il peut être possible d'essayer de contrôler la contamination bactérienne par incubation de l'échantillon une nuit à 4 °C dans un milieu de transport contenant des antibiotiques, suivie d'une centrifugation et remise en suspension du culot avant dilution et inoculation de l'échantillon sur cultures cellulaires.

La présence d'anticorps anti-VAE dans le plasma séminal de certains étalons ne semble pas empêcher leur détection comme animaux porteurs.

b) Méthodes d'identification de l'acide nucléique

Les techniques de RT-PCR classique en deux temps, étape de RT-PCR puis une RT-PCR en temps réel (rRT-PCR) sont de plus en plus utilisées comme alternatives à l'isolement du virus en culture cellulaire pour la détection du virus de l'AVE dans les prélèvements. Les épreuves de RT-PCR permettent l'identification de l'ARN spécifique du virus dans les prélèvements, à savoir les écouvillons naso-pharyngés, la fraction leucocytaire (buffy coat), le sperme total ou dilué, l'urine et les tissus collectés à l'autopsie (5, 6, 27, 55, 56, 64). Des techniques de RT-PCR simple ou en deux temps, de RT-PCR nichée (RT-nPCR) et de RT-PCR TaqMan® ont été développées et testées pour la mise en évidence du virus dans du milieu de culture cellulaire, dans le sperme et les sécrétions nasales (5, 6, 12, 27, 38, 50, 51, 53, 55, 56, 64, 66). Ces épreuves ciblent 6 cadres de lecture différents (ORFs) dans le génome du virus de l'AVE (ORFs 1b, 3-7).

Cependant, de grandes variations existent au niveau de la sensibilité et de la spécificité entre les épreuves de RT-PCR qui incorporent différentes amorces ciblant différents ORFs (6). Des résultats comparables à ceux de l'isolement viral ont été obtenus avec quelques RT-PCR simple, RT-PCR en deux temps, RT-PCR nichée ou TaqMan® RT-PCR, mais pas avec toutes (5, 6, 9, 27, 38, 51, 53, 56, 66). Comparées avec les épreuves classiques d'isolement viral, les épreuves basées sur la RT-PCR se sont révélées fréquemment plus sensibles, moins coûteuses et considérablement plus rapides, la plupart d'entre elles prenant moins de 24 h. En outre, les épreuves de RT-PCR ne nécessitent pas l'utilisation de virus vivant. L'épreuve de TaqMan® RT-PCR est une méthode simple, rapide et fiable pour la détection et l'identification de l'ARN viral dans le sperme des chevaux et les milieux de culture cellulaire (5, 38). Sur les épreuves classiques de RT-PCR en deux temps, elle présente les avantages suivants : 1) élimination du risque de contamination croisée entre les échantillons et les produits d'amplifications précédentes puisque le tube n'est pas ouvert pendant la réalisation ; 2) réduction du risque de réactions faussement positives puisque le produit d'amplification est détecté par une sonde spécifique. Du fait de la grande sensibilité de la technique de RT-PCR, et en l'absence de procédures de sécurité appropriées dans les laboratoires, il existe potentiellement des risques de contamination croisée entre échantillons donnant des résultats faussement positifs. Par exemple, l'épreuve de RT-PCR nichée qui augmente la sensibilité de la détection du virus augmente aussi le risque de résultats faussement positifs (6). Les risques de contamination croisée sont plus élevés avec la RT-PCR nichée du fait d'une étape de transcription reverse séparée de la seconde étape d'amplification. Afin de minimiser les risques, des grandes précautions doivent être prises notamment pendant les étapes d'extraction de l'ARN et la réalisation de la réaction. Il est nécessaire d'inclure dans chaque essai par PCR des témoins positifs et négatifs de VAE judicieusement choisis, ainsi que de l'ARN extrait de cultures cellulaires infectées et non infectées. En de nombreuses occasions, l'emploi d'épreuves de RT-PCR simple ou de RT-PCR dans un seul tube supprimera les problèmes liés aux contaminations croisées.

La sélection des amorces (et de la sonde dans le cas de la rRT-PCR) étant essentielle dans la sensibilité des épreuves par RT-PCR, les amorces doivent de préférence être choisies dans la (ou les) région(s) la(es) plus conservée(s) du génome viral. Une analyse comparative des séquences de nucléotides a montré que les cadres de lecture ORF 1b (codant la polymérase virale), ORF 6 (codant la protéine M) et ORF 7 (codant la nucléocapside, N) sont plus conservés que les autres ORF parmi les souches de virus de l'AVE étudiées jusqu'à présent en Amérique et en Europe (3, 4, 38, 64). Le gène le mieux conservé est l'ORF 7 et les amorces spécifiques de ce gène (ainsi que la sonde dans le cas de la rRT-PCR) ont permis d'identifier diverses souches originaires d'Europe ou d'Amérique du Nord (5, 6, 38, 53, 56). Par ailleurs, l'utilisation de plusieurs paires d'amorces pour différents ORFs 1b ([amorce de tête : 5'-GAT-GTC-TAT-GCT-CCA-TCA-TT-3' et amorce de queue : 5'-GGC-GTA-GGC-TCC-AAT-TGA-A-3']) (12) et/ou [amorce de tête : 5'-CCT-GAG-ACA-CTG-AGT-CGC-GT-3' et amorce de queue 5'-CCT-GAT-GCC-ACA-TGG-AAT-GA-3']) (27), ORF 6 ([amorce de tête : 5'-CTG-AGG-TAT-GGG-AGC-CAT-AG-3' et amorce de queue : 5'-GCA-GCC-AAA-AGC-ACA-AAA-GC-3']) (51) et ORF 7 ([amorce de tête : 5'-ATG-GCG-TCA-AGA-CGA-TCA-CG-3' et amorce de queue : 5'-AGA-ATA-TCC-ACG-TCT-TAC-GGC-3']) (53) a considérablement augmenté les chances de détection des souches d'Amérique du Nord ou d'Europe dans les épreuves de RT-PCR. Les deux paires d'amorces spécifiques de ORF 1b conviennent pour les épreuves de RT-nPCR (6, 12, 27). Bien que les épreuves de RT-PCR se soient révélées hautement sensibles pour détecter l'acide nucléique viral dans le sperme frais total, il existe des arguments qui laissent à penser que la fiabilité n'est pas aussi grande quand il s'agit de sperme congelé ou dilué avec un taux d'infection faible (66).

En plus des épreuves de RT-PCR utilisées actuellement, deux épreuves de TaqMan® RT-PCR dans un tube avec amorce fluorescente ont été décrites pour la détection de l'acide nucléiques du VAE (5) ; amorces ([de tête : 5'-GGC-GAC-AGC-CTA-CAA-GCT-ACA-3', de queue : 5'-CGG-CAT-CTG-CAG-TGA-GTG-A-3']) et sonde [5'-FAM-TTG-CGG-ACC-CGC-ATC-TGA-CCA-A-TAMRA-3'] (64) ; amorces : [de tête : 5'-GTA-CAC-CGC-AGT-TGG-TAA-CA-3', de queue : 5'-ACT-TCA-ACA-TGA-CGC-CAC-AC-3'] et sonde [5'-FAM-TGG-TTC-ACT-CAC-TGC-AGA-TGC-CGG-TAMRA-3']). Il convient néanmoins de remarquer que les variations génomiques entre les isolats du terrain peuvent réduire la sensibilité des deux épreuves RT-PCR et rRT-PCR, même si les amorces et les sondes sont tirées des parties les plus conservées du génome du VAE (ORF 7 [38]).

En l'absence d'un accord général sur un couple d'amorces universelles pour le VAE et comme aucune épreuve de RT-PCR ne peut déterminer l'infectivité actuelle d'un échantillon, il convient, lors de l'identification du virus dans des échantillons cliniques ou post-mortem, de réaliser un isolement du virus en même temps que les épreuves de RT-PCR ou de rRT-PCR.

Les souches d'AVE isolées de différentes régions du globe ont été classées en différents groupes phylogéniques par analyse des séquences des gènes codant les protéines GP3, GP5 et la protéine d'enveloppe M (ORFs 3, 5 et 6 respectivement) et du gène codant la protéine de nucléocapside N (ORF 7 [(2, 8, 13, 54, 65)]. Dans ce but, le gène de la GP5 semble être le plus utile et le plus fiable (8, 54, 65). La recherche par séquençage nucléotidique de parentés entre souches est un outil épidémiologique utile pour déterminer l'origine d'un foyer d'AVE (2, 4, 65).

c) Méthodes histologiques et immunohistochimiques

En cas de mortalité dans un foyer suspect d'AVE, on peut rechercher par histologie dans un large échantillonnage de tissus une panvasculite particulièrement prononcée au niveau des petites artères dans tout le corps notamment au niveau du cæcum, du colon, de la rate, des glandes lymphatiques et du cortex surrénal (16, 18, 33). La présence d'une artérite nécrosante disséminée incluant les cellules endothéliales et médiales des vaisseaux est considérée comme pathognomonique de l'AVE. Les lésions vasculaires caractéristiques chez l'animal adulte ne sont cependant pas un trait dominant dans la plupart des avortements dus à l'AVE (32).

L'antigène de l'AVE peut être identifié dans divers tissus des animaux infectés en présence ou en absence de lésions (18). L'antigène a été mis en évidence dans les poumons, le cœur, le foie, la rate et le placenta des avortons (18, 56). L'examen immunohistochimique de biopsies de peau a été évalué comme un moyen de confirmer une infection aiguë par le VAE. Il ne semble pas entièrement fiable pour réaliser le diagnostic de la maladie. L'antigène viral peut être détecté dans le cytoplasme des cellules infectées par immunofluorescence en utilisant un conjugué polyclonal anti-AVE (16) ou par la technique ABC utilisant des AcMs de souris dirigés contre la GP5 (28) ou la protéine N (18, 37, 40, 56).

2. Épreuves sérologiques

Une variété d'épreuves sérologiques comprenant la séroneutralisation par microméthode (52) et par réduction des plaques (41), la fixation du complément (FC) (22), l'immunofluorescence indirecte (16), l'immunodiffusion en gélose (16), l'ELISA (11, 14, 30, 31, 35, 48) et les épreuves immunologiques à microbilles fluorescentes (MIA pour *fluorescent microsphere immunoassay*) (Go, communication personnelle) ont été utilisées pour détecter les anticorps dirigés contre l'AVE.

L'épreuve la plus couramment utilisée au niveau mondial pour identifier une infection, établir une séroprévalence et contrôler les chevaux à l'exportation est l'épreuve de séroneutralisation par microméthode en présence de complément. Elle a aussi été utilisée sur du sang de cœur d'avorton pour le diagnostic rétrospectif d'avortements liés au VAE (56). En dehors de l'épreuve de SN, le test de FC est utilisé pour le diagnostic des infections récentes d'AVE car les anticorps fixant le complément ont une durée de vie plus brève (22). À l'opposé, les anticorps neutralisants vis-à-vis le l'AVE peuvent fréquemment persister plusieurs années après une infection naturelle (59). Bien que différentes épreuves ELISA aient été développées (11, 14, 30, 31, 35, 48), aucune n'a été jusqu'à présent aussi largement validée que l'épreuve de SN, bien qu'elles apparaissent presque comparables en sensibilité et en spécificité (11, 30, 31, 48). À la différence de l'épreuve de SN, une réaction positive pour une épreuve ELISA ne reflète pas automatiquement un état d'immunité du cheval testé vis-à-vis de l'AVE, car les anticorps non-neutralisants et les anticorps neutralisants sont tous deux détectés indifféremment.

Des antisérums contre du virus non purifié de l'AVE ont été préparés sur chevaux et lapins par les méthodes conventionnelles d'immunisation. De plus des anticorps monoclonaux et monospécifiques de souris ont été préparés vis-à-vis de la nucléocapside (N), de la protéine majeure d'enveloppe (GP5), et de la protéine d'enveloppe non-glycosylée (M) (7, 17, 28, 39, 40).

Des sérums de référence de l'OIE sont disponibles² et peuvent faciliter la normalisation internationale de l'épreuve de séroneutralisation par micro méthode ou par ELISA.

Il n'a été identifié qu'un seul sérotype majeur de l'AVE jusqu'à présent (41, 59). Celui-ci n'est représenté que par la souche de référence *Bucyrus* (ATCC VR 796). Le virus de référence utilisé dans le test de SN est la souche CVL-Bucyrus (Weybridge). Le stock d'origine du virus est multiplié sur des cellules RK-13, puis il est débarrassé de ses débris cellulaires par une centrifugation à basse vitesse et conservé en aliquots à -70 °C. Plusieurs aliquots sont ensuite décongelés et le titre moyen est déterminé par titrage en cellules RK-13.

a) Épreuve de séroneutralisation (Épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

L'épreuve de SN est utilisée pour détecter les étalons infectés par l'AVE et déterminer s'il est nécessaire de procéder à une recherche de virus dans le sperme par culture cellulaire ou par une épreuve de RT-PCR. Elle est aussi utilisée pour confirmer une infection dans les cas suspects d'AVE. L'épreuve de SN couramment utilisée est celle établie par les laboratoires des services nationaux vétérinaires du ministère de l'Agriculture des États-Unis d'Amérique (52). Il importe que les échantillons de sang soient prélevés stérilement car une contamination bactérienne des sérums peut interférer avec le résultat de l'épreuve. Il est recommandé de réaliser cette épreuve sur cellules RK-13 en utilisant la souche agréée CVL-Bucyrus

² Disponible auprès du Dr P.J. Timoney, Director, Maxwell H. Gluck Equine Research Center, Dept of Veterinary Science, University of Kentucky, Lexington, Kentucky 40546-0099, États-Unis d'Amérique.

(Weybridge) de référence comme souche de virus AVE³ (20). Bien que provenant à l'origine de la souche prototype Bucyrus, le nombre de passages de cette souche n'est pas bien déterminé. La sensibilité de l'épreuve de SN pour la détection des anticorps anti-AVE peut être influencée par différents facteurs, notamment l'origine et le nombre de passages de la souche utilisée (20, 21). La souche CVL-Bucyrus (Weybridge) et la souche très atténuée d'AVE utilisé pour le vaccin à virus vivant modifié (VVM) ont une sensibilité comparable pour la détection des sérums faiblement positifs en particulier des animaux vaccinés. Des efforts sont en cours pour arriver à une meilleure harmonisation des protocoles et obtenir des résultats comparables entre épreuves de SN ou d'autres épreuves sérologiques comparables.

• **Protocole**

- i) Les sérums sont inactivés 30 min en bain-marie à 56 °C (les sérums témoins ne sont inactivés qu'une fois pour toute).
- ii) Des dilutions en série de 2 en 2 des sérums inactivés dans du milieu de culture sans sérum (volume 25 µl) sont réalisées dans une microplaque à 96 puits à fond plat dans des plaques pour cultures cellulaires en partant de la dilution 1/2 à raison de deux rangées de puits pour chaque sérum à tester. La plupart des sérums sont testés initialement aux dilutions de 1/4 et 1/8 (c.à.d. la dilution finale du sérum après addition d'un volume égal de virus à la dilution appropriée dans chaque puits). Les sérums témoins positifs à la dilution 1/8 peuvent si nécessaire être testés de nouveau et titrés afin de déterminer leur dilution finale. En même temps, des témoins négatifs et les sérums témoins à faible et fort titre doivent être inclus dans chaque réaction.
- iii) Une dilution du stock d'origine du virus contenant 100 à 300 DICT₅₀ (dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) est préparée sous un volume de 25 µl à l'aide d'un milieu de culture pour cellules sans sérum contenant des antibiotiques et du complément de cobaye frais à la dilution finale de 10 %.
- iv) 25 µl de la dilution appropriée de virus provenant du stock d'origine sont ajoutés à chaque puits contenant 25 µl de chaque sérum en utilisant 4 puits par dilution décimale sauf dans les puits contenant les sérums témoins.
- v) Un titrage de la solution virale de travail est inclus, en utilisant 4 puits par dilution décimale afin de confirmer la validité des résultats.
- vi) Les plaques sont recouvertes et agitées doucement afin de faciliter le mélange sérum-virus.
- vii) Les plaques sont mises à incuber 1 h en étuve à 37 °C sous atmosphère humide à 5 % de CO₂.
- viii) Une suspension de cellules de 3 à 5 jours de cellules RK 13 est préparée de façon à assurer un tapis cellulaire confluent environ 18 à 24 h après ensemencement.
- ix) 100 µl de suspension cellulaire sont ajoutés à chaque puits, les plaques sont fermées avec leurs couvercles ou scellées à l'aide d'un adhésif et agitées doucement.
- x) Les plaques sont mises à incuber à 37 °C en atmosphère humide sous 5 % de CO₂.
- xi) Les plaques sont lues au microscope pour recherche d'un ECP non spécifique au bout de 12 à 18 h puis pour recherche d'un ECP viral après 48 à 72 h d'incubation. La validité de l'épreuve est confirmée en vérifiant que la dilution de travail du stock d'origine de virus contenant 30 à 300 DICT₅₀ de virus et les titres des sérums témoins positifs sont bien conformes aux titres attendus (dans les limites de 0,3 log₁₀).

Une dilution de sérum est considérée comme positive si on observe 75 % ou mieux 100 % de réduction de l'ECP par puits de sérum testé comparé à ce qui est observé dans les puits de plus basses dilutions du virus témoin. Les dilutions finales sont calculées en utilisant la méthode de Spearman-Kärber (34). Un titre de 1/4 ou au-dessus est considéré comme positif. Un sérum témoin négatif ne doit faire apparaître que des traces (moins de 25 %) de neutralisation du virus ou pas de neutralisation du tout à la plus basse dilution. Les titres d'anticorps peuvent être difficiles à déterminer, car une neutralisation partielle peut être observée à différentes dilutions. En pareil cas, il n'est pas possible de déterminer si l'échantillon est négatif ou faiblement positif. La difficulté en cas de sérum toxique peut être surmontée en testant un autre échantillon du sérum de l'animal concerné ou en testant à nouveau le sérum d'origine sur plaques de culture contenant des tapis confluent de cellules RK-13 de 24 h. Il a été signalé que la cytotoxicité d'un sérum peut, dans certains cas, être diminuée ou éliminée en procédant à une absorption de l'échantillon sur un culot de cellules RK-13 avant l'épreuve, ou par substitution du complément de cobaye par du complément de lapin dans le diluant du virus. Le statut vaccinal des chevaux vis-à-vis des herpès équins doit aussi être pris en considération en cas de cytotoxicité d'origine non virale. Un des vaccins anti-herpès virus équin disponible en Europe peut stimuler la production d'anticorps anti-cellules de rein de lapin qui sont utilisées dans la

3 Disponible auprès du Dr T.W. Drew, Mamalian Virology Department, Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, New Haw, Addlestone KT15 3NB, Royaume-Uni, adresse E-mail : vla@gfnet.gov.uk.

production du vaccin ; cela survient avec les dilutions du sérum au 1/4 et/ou 1/8, ce qui peut compliquer l'interprétation des résultats (26, 47).

b) Épreuve immuno-enzymatique

Un certain nombre d'ELISAs directs ou indirects ont été développés pour détecter les anticorps anti-AVE (11, 14, 30, 31, 35, 48). Ils sont basés sur l'emploi de virus purifié ou d'antigènes viraux recombinants. La mise en œuvre des premiers essais par cette méthode a été compromise par le nombre élevé de faux positifs détectés à l'époque (15). Dans le dernier, il fut utilisé des anticorps dirigés contre divers antigènes de culture tissulaire présents dans le sérum des chevaux qui avaient été vaccinés avec ces antigènes (15). Lorsque l'importance de la protéine virale GP5 dans la stimulation immunitaire humorale vis-à-vis de l'AVE, fut identifiée, plusieurs ELISAs ont été développés en utilisant tout ou partie de la protéine recombinante produite par un système d'expression en bactérie ou en baculovirus (14, 17, 30). Plus récemment un peptide synthétique conjugué à l'ovalbumine correspondant aux acides aminés 81 à 106 de la protéine GP5 a été utilisé (48). Les essais pratiqués montrent une sensibilité et une spécificité presque comparables à l'épreuve de SN et les anticorps spécifiques de l'AVE pourraient être détectés par ELISA avant qu'ils ne soient détectables par SN (11). Cependant, des réactions faussement négatives peuvent être observées dans quelques cas. Le criblage d'une banque de phages aléatoires à l'aide de sérums polyclonaux a permis d'identifier des ligands qui ont été purifiés et utilisés dans un ELISA pour l'AVE (31). Il n'a cependant pas été possible de mettre en évidence de corrélation entre les valeurs d'absorption obtenues par cette technique et les anticorps neutralisants ce qui démontre que les anticorps détectés sont largement dirigés contre des épitopes internes du virus. Un ELISA basé sur la combinaison des protéines structurales GP5, M et N du virus AVE exprimées en baculovirus a permis de détecter des anticorps antiviral chez des animaux infectés expérimentalement mais pas chez des animaux vaccinés (30). Un élément essentiel dans les ELISAs AVE basés sur toute protéine GP5 est le fait que la sensibilité de l'épreuve dépend des séquences de l'ectodomaine de la protéine virale utilisée. Des variations considérables à l'intérieur de ce domaine ont été mises en évidence entre les souches des virus (7). Afin d'optimiser la sensibilité des ELISAs basés sur la protéine GP5, il est nécessaire d'inclure plusieurs séquences d'ectodomaine représentatives de souches différentes au plan phénotypique plutôt que de se contenter d'un seul ectodomaine. Deux autres ELISAs décrits récemment semblent plus fiables comme épreuves de diagnostic sérologique des infections à VAE (14, 48). Un ELISA de blocage impliquant des AcMs anti-protéine GP5, a été décrit comme présentant une sensibilité de 99,4 % et une spécificité de 97,7 % par rapport à l'épreuve de SN (14). Dans un autre essai un ELISA utilisant un peptide synthétique GP5 combiné à l'ovalbumine a présenté une sensibilité de 96,75 % et une spécificité de 95,6 % vis-à-vis d'un panel de 400 sérums positifs par SN et 400 sérums négatifs par SN (48). Une épreuve ELISA, ayant une sensibilité et une spécificité très proche sinon identique à l'épreuve de SN sera prochainement disponible.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Un certain nombre de vaccins expérimentaux et commerciaux ont été développés contre l'AVE. De façon générale, deux vaccins sont disponibles commercialement, tous deux préparés sur cultures cellulaires. Le premier est un vaccin à virus vivant modifié (VVM) préparé à partir d'un virus atténué pour le cheval par des passages successifs en culture de cellules de lapin et de cheval (19, 41). Ce vaccin est agréé pour les étalons, les juments non gestantes et les chevaux qui ne sont pas destinés à la reproduction. Alors que les chevaux non destinés à la reproduction peuvent être vaccinés à n'importe quel moment, les juments et les étalons ne doivent pas être vaccinés moins de 3 semaines avant une saillie. Le vaccin n'est pas indiqué chez les juments gestantes en particulier pendant les 2 derniers mois de gestation ni chez les poulains de moins de 6 semaines, sauf en cas de risque significatif de contamination. Le vaccin est disponible aux USA et au Canada. Il a été utilisé également en Nouvelle-Zélande sous contrôle officiel afin d'aider au programme d'éradication de l'AVE.

Le second vaccin contre l'AVE, disponible commercialement, est un vaccin inactivé préparé à partir d'un virus multiplié en culture de cellules équines, filtré, inactivé chimiquement et mélangé à un adjuvant métabolisable. Ce vaccin n'est habituellement pas recommandé chez les juments gestantes. La vaccination initiale comprend deux injections de vaccin par voie intramusculaire pratiquées entre 3 à 6 semaines d'intervalle. Les injections de rappel sont effectuées tous les 6 mois comme préconisé par le fabricant. Ce vaccin inactivé est agréé dans certains pays européens tels que l'Allemagne, le Danemark, la France, la Hongrie, l'Irlande, la Suisse et le Royaume-Uni.

Un autre vaccin inactivé contre l'AVE a été développé au Japon en cas de foyer d'AVE dans ce pays (24). C'est un vaccin inactivé par le formol combiné avec un adjuvant aqueux qui s'est montré efficace et sans danger chez les chevaux reproducteurs ou non. Pour une immunisation optimale il est nécessaire de pratiquer deux injections

à 4 semaines d'intervalle puis un rappel tous les 6 à 12 mois. Ce vaccin n'étant pas commercialisé, on ne dispose pas de plus amples informations à son sujet.

Les lignes directrices pour la fabrication de vaccins vétérinaires sont exposées 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 et peuvent être complétées par des exigences nationales et régionales.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Les vaccins commercialisés VVM ou à virus inactivé sont préparés à partir de la souche prototype d'AVE Bucyrus (ATCC VR 796). Toutes les preuves dont on dispose indiquent qu'il n'existe qu'un seul sérotype majeur du virus et que les variations entre souches ne sont pas significatives quant à l'efficacité du vaccin (41, 59).

En cas de VVM, la souche prototype est atténuée par une série de passages en cultures de cellules de première explantation de rein de cheval (HK131), de rein de lapin (RK111) et d'une lignée de cellules dermiques équines diploïdes ATCC CCL 57 (ECID-24) (19, 29, 41). À l'usage, ce vaccin se révèle sans danger et immunogène entre le 80 et le 111^e passage en cellules de première explantation de rein de lapin (19, 29, 41, 44, 45, 61).

Le vaccin inactivé adjuvé est préparé à partir de la souche prototype *Bucyrus* non atténuée (ATCC VR 796) clonée en plaque à son quatrième passage en lignée de cellules dermiques diploïdes équines (ECID-4). Après multiplication en culture cellulaire le virus est ensuite purifié par filtration puis inactivé chimiquement et adjuvé.

Pour chaque vaccin des lots adéquats de semence primaire de virus doivent être conservés en azote liquide ou dans des conditions équivalentes.

b) Méthode de culture

Aussi bien pour la production de vaccins VVM que de vaccins à virus inactivé, les virus doivent être multipliés sur un système stable de culture cellulaire tel que les cellules dermiques équines, en utilisant un milieu approprié supplémenté avec du sérum de bovin stérile ou de la sérum albumine bovine. Les tapis cellulaires monocouches doivent être lavés avant inoculation de virus afin d'enlever les traces de sérum bovin. Une intense multiplication cellulaire est mise en évidence par l'apparition de 80 à 100 % d'ECP en 2 à 3 jours.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Tant pour les vaccins VVM que pour les vaccins à virus inactivé chacune des souches de virus considérées doit être multipliée sur un système cellulaire approprié et approuvé pour la production de vaccins et pour lesquelles l'absence de contamination par des bactéries, des levures, des mycoplasmes ou des virus a été confirmée (46). L'identité du virus contenu dans la semence primaire d'origine doit être confirmée par neutralisation à l'aide d'un sérum anti-VAE homologue. Une neutralisation incomplète par un sérum homologue de cheval ou de Lapin a scientifiquement été observée (46, 52), et constitue un problème lorsqu'on teste la semence primaire vis-à-vis de virus étrangers afin de confirmer l'identité du virus vaccinal. Le problème peut être résolu en diminuant le titre infectieux de la semence primaire en dessous de celui requis pour la préparation de la solution de virus vaccinal et réaliser l'épreuve de séroneutralisation sur le virus dilué. Le mélange virus-sérum est testé afin de détecter le virus résiduel vivant par passage successif en culture cellulaire. Aucun virus cytopathogène, hémadsorbant ou de souche non-cytopathogène du virus de la diarrhée bovine, ne doit être détecté par isolement sur culture cellulaire. Si on utilise des cellules d'origine équine, il faut vérifier qu'elles sont indemnes du virus de l'anémie infectieuse équine. Les plus récentes techniques de PCR et d'ELISA de capture peuvent être utilisées comme compléments à l'isolement viral et à la détection d'agents étrangers.

Utilisé chez les étalons et les juments non gestantes le vaccin VVM s'est montré sans danger et efficace (44, 45, 61). Bien que son utilisation chez les juments gravides ne soit pas recommandée par le fabricant, spécialement au cours des deux derniers mois de la gestation, le vaccin a néanmoins servi à immuniser des juments gravides lors de risque élevé d'exposition au virus de l'AVE ; peu voir aucun effet néfaste n'ont alors été rapportés. La vaccination confère un niveau élevé d'immunité protectrice persistant pendant plusieurs années (29, 41, 59). Sur la base d'études expérimentales et d'un large usage sur le terrain depuis 1985, il n'a pas été mis en évidence de reversion vers la virulence du virus vaccinal ni de recombinaison entre le

virus vaccinal et une souche de virus sauvage infectieux. De plus, il n'existe pas de preuve que la souche atténuée du vaccin actuel colonise l'appareil génital des étalons ou favorise le portage de virus par les étalons vaccinés (45, 59, 60, 61).

Le vaccin inactivé du commerce n'entraîne pas de réaction indésirable et apparaît sans danger chez les chevaux en bonne santé à la reproduction ou non. Des réactions locales transitoires on pu être observées sur moins de 10 % des animaux vaccinés avec le vaccin inactivé. Des études restreintes sur le terrain indiquent que ce vaccin est immunogène et stimule l'immunité à un niveau satisfaisant mais dont la durée n'est pas établie jusqu'à présent.

Bien qu'il n'existe pas de rapports publiés sur l'efficacité de l'un ou l'autre des vaccins du commerce dans la prévention de l'apparition de l'état de porteurs sains parmi les étalons un vaccin expérimental aqueux contre l'AVE inactivé au formol s'est révélé capable d'empêcher la persistance du virus dans l'appareil reproducteur des étalons après épreuve (23).

2. Méthode de fabrication

Les vaccins à virus vivant modifié et les vaccins inactivés sont produits par culture sur système cellulaire de derme équin. Les tapis monocouche doivent être lavés avant inoculation avec la semence virale afin d'enlever toute trace de sérum bovin dans le milieu de culture. Les cellules inoculées doivent être maintenues en milieu de culture approprié. La récolte des cultures infectées doit être faite lorsque le tapis cellulaire présente presque complètement un ECP caractéristique. Le surnageant et les cellules sont récoltés et les débris cellulaires et autres matériels indésirables sont éliminés par filtration. Dans le cas des vaccins inactivés, le virus purifié est inactivé chimiquement et un adjuvant métabolisable est ajouté.

3. Contrôle en cours de fabrication

Les vaccins VVM et à virus inactivé doivent être produits dans une lignée cellulaire stable dont l'identité a été testée et qui est confirmée indemne de contamination par des bactéries, des levures, des mycoplasmes ou tout autres agents externes. Par ailleurs pour le contrôle de la semence primaire avant production de chaque vaccin et des lignées pour les contaminants externes, les cultures cellulaires infectées avec chacun des virus vaccinaux doivent faire l'objet d'un examen macroscopique pour recherche d'une multiplication bactérienne ou d'autre contamination extérieure pendant la période d'incubation. Si on ne peut pas établir de façon fiable à l'examen visuel la présence d'éléments contaminant dans un récipient de culture, il faut procéder à des sous-cultures, à des examens microscopiques ou aux deux.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et d'absence de contamination des matériels biologiques peuvent être consultés au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Dans le cas de vaccins VVM et de vaccins à virus inactivé chaque lot de vaccin doit être testé vis-à-vis des contaminations par des bactéries, des moisissures ou des mycoplasmes, l'innocuité du vaccin doit être contrôlée par inoculation intramusculaire d'une dose de vaccin lyophilisé à au moins 2 chevaux séronégatif vis-à-vis de l'AVE (46). Aucun des chevaux inoculés ne doit présenter de signes cliniques de maladie autre qu'une légère élévation de température au cours des 2 semaines d'observation qui suivent. De plus des écouvillonnages nasaux seront effectués quotidiennement pour recherche du virus. Une numération des cellules blanches et un relevé de température seront également effectués quotidiennement. Aucun changement hématologique ni de température ne doit survenir après vaccination (45, 59, 61). Une excrétion limitée de virus vaccinal par l'appareil respiratoire pendant au plus 7 jours, peut être observée occasionnellement sur des chevaux vaccinés (61). La persistance du virus vaccinal dans l'appareil reproducteur n'a pas été mise en évidence après vaccination des étalons (45, 60, 61).

Pour s'assurer de l'inactivation complète du virus utilisé dans le vaccin, chaque série de lot de ce vaccin inactivé doit être vérifié par une série de 3 passages sur des cellules dermiques de chevaux puis par une épreuve d'immunofluorescence directe avec des anticorps spécifique de l'AEV qui seront par la suite combiné à un adjuvant. Cela devra être suivi de tests d'innocuité supplémentaire chez le cobaye et la souris.

c) Activité

L'activité des vaccins dans leur présentation finale est contrôlée par la méthode des plages sur cultures cellulaires dermiques équines et par épreuve vaccinale chez le cheval (46), le vaccin doit être contrôlé en triple sur culture cellulaire, le titre infectieux moyen est calculé et la dose vaccinale déterminée en fonction du principe selon lequel chaque dose ne doit pas contenir moins de 3×10^4 unités formant plaque de virus vaccinal atténué. L'activité *in vivo* des vaccins modifiés et des vaccins inactivés est évaluée par une épreuve vaccinale unique sur 17 à 20 animaux vaccinés incluant 5 à 7 chevaux témoins et réalisée en 2 fois avec 10 vaccinés et 5 témoins à chaque fois.

La concentration en antigène viral dans le vaccin inactivé est environ mille fois supérieure à celle présente dans les vaccins à virus vivant modifié.

d) Durée de l'immunité

Des anticorps neutralisants anti-AVE doivent apparaître sur la plupart des chevaux entre 1 et 2 semaines après vaccination avec le vaccin VVM (44, 45, 58, 59, 61). Les réponses à la primovaccination varient selon les études. Dans une étude sur la vaccination des étalons, une chute rapide du titre en anticorps a été constatée, avec un nombre significatif d'animaux redevenant séronégatifs 1 à 3 mois après vaccination (61). D'autres études font état d'une excellente réponse durable avec persistance de niveau élevé en anticorps neutralisants pendant 1 à 2 ans (58). Une revaccination entraîne une excellente réponse anamnétique et le titre des anticorps reste relativement constant pendant plusieurs années (59).

Des études expérimentales ont montré que la plupart des chevaux vaccinés avec le vaccin inactivé développaient des titres d'anticorps neutralisants bas ou modérés vis-à-vis du VAE, 14 jours après la seconde vaccination. On ne dispose pas d'information publiée sur la durée de l'immunité conférée par ce vaccin.

e) Stabilité

Le vaccin lyophilisé VVM peut être conservé pendant au moins 3 à 4 ans et entre 2 °C et 7 °C, sans perte d'infectiosité, à condition d'être conservé dans l'obscurité (29). L'infectiosité peut persister beaucoup plus longtemps si le vaccin est conservé à -20 °C ou en dessous. Une fois réhydraté le vaccin doit être utilisé dans l'heure qui suit ou détruit. Le vaccin inactivé est conservé en suspension liquide entre 2 et 8 °C sans perte d'activité pendant au moins 1 an s'il est protégé de la lumière.

f) Agents de conservation

Les conservateurs ajoutés au vaccin à virus modifié et au vaccin inactivé sont la néomycine, la polymyxine B et l'amphotéricine B.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Les juments gestantes ne doivent pas être vaccinées avec le vaccin à virus vivant modifié pendant les deux derniers mois de gestation car il y a un risque, bien minime, de passage du virus vaccinal au fœtus. La possibilité d'une réaction anaphylactique vaccinale bien que très rare peut survenir suite à l'administration, soit de vaccin à virus vivant modifié, soit de vaccin inactivé. En l'absence de données suffisantes sur son innocuité, l'administration du vaccin inactivé aux juments gestantes n'est pas recommandée.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

A l'exception du vaccin inactivé dont la stérilité doit être contrôlée une deuxième fois pour s'assurer de l'absence de contamination, il n'est pas exigé d'autres contrôles d'innocuité pour les vaccins VVM.

b) Activité

Tant pour les vaccins à virus vivant modifié que pour le vaccin inactivé, il n'est pas exigé d'autres contrôles que ceux pratiqués en cours de production des lots.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ASAGOE T., INABA Y., JUSA E.R., KOUNO M., UWATOKO K. & FUKUNAGA Y. (1997). Effect of heparin on infection of cells by equine arteritis virus. *J. Vet. Med. Sci.*, **59**, 727–728.

2. BALASURIYA U.B.R., EVERMANN J.F., HEDGES J.F., MCKEIRNAN A.J., MITTEN J.Q., BEYER J.C., MCCOLLUM W.H., TIMONEY P.J. & MACLACHLAN N.J. (1998). Serologic and molecular characterization of an abortigenic strain of equine arteritis virus isolated from infective frozen semen and an aborted equine fetus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **213**, 1586–1589.
3. BALASURIYA U.B.R., HEDGES J.F., NADLER S.A., MCCOLLUM W.H., TIMONEY P.J. & MACLACHLAN N.J. (1999). Genetic stability of equine arteritis virus during horizontal and vertical transmission in an outbreak of equine viral arteritis. *J. Gen. Virol.*, **80** (8), 1949–1958.
4. BALASURIYA U.B., HEDGES J.F., SMALLEY V.L., NAVARETTE A., MCCOLLUM W.H., TIMONEY P.J., SNIJDER E.J. & MACLACHLAN N.J. (2004). Genetic characterization of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. *J. Gen. Virol.*, **85**, 379–390.
5. BALASURIYA U.B.R., LEUTENEGGER C.M., TOPOL J.B., MCCOLLUM W.H., TIMONEY P.J. & MACLACHLAN N.J. (2002). Detection of equine arteritis virus by real-time TaqMan® reverse transcription-PCR assay. *J. Virol. Methods*, **101**, 21–28.
6. BALASURIYA U.B.R. & MACLACHLAN N.J. (2004). Polymerase chain reaction-based diagnostics for equine arteritis virus: uses, limitations and future prospects. In: Proceedings of the International Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection, Timoney P.J., ed. M.H. Cluck Equine Research Center, 20–21 October 2004, Lexington, Kentucky, USA.
7. BALASURIYA U.B.R., PATTON J.F., ROSSITO P.V., TIMONEY P.J., MCCOLLUM W.H. & MACLACHLAN N.J. (1997). Neutralization determinants of laboratory strains and field isolates of equine arteritis virus: Identification of four neutralization sites in the amino-terminal ectodomain. *Virology*, **232**, 114–128.
8. BALASURIYA U.B.R., TIMONEY P.J., MCCOLLUM W.H. & MACLACHLAN N.J. (1995). Phylogenetic analysis of open reading frame 5 of field isolates of equine arteritis virus and identification of conserved and nonconserved regions in the G_L envelope glycoprotein. *Virology*, **214**, 690–697.
9. BELAK S., BALLAGI-PORDANY A., TIMONEY P., MCCOLLUM W.H., LITTLE T.V., HYLLSETH B. & KLINGEBORN B. (1995). Evaluation of a nested PCR assay for the detection of equine arteritis virus infection. Proceedings of the 7th International Conference on Equine Infectious Diseases, Tokyo, Japan, 1994, 33–38.
10. CAVANAGH D. (1997). Nidovirales: A new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.*, **142**, 629–633.
11. CHIRNSIDE E.D., FRANCIS P.M., DE VRIES A.A.F., SINCLAIR R. & MUMFORD J.A. (1995). Development and evaluation of an ELISA using recombinant fusion protein to detect the presence of host antibody to equine arteritis virus (EAV). *J. Virol. Methods*, **54**, 1–13.
12. CHIRNSIDE E.D. & SPAAN W.J. (1990). Reverse transcription and cDNA amplification by the polymerase chain reaction of equine arteritis virus (EAV). *J. Virol. Methods*, **30**, 133–140.
13. CHIRNSIDE E.D., WEARING C.M., BINNS M.M. & MUMFORD J.A. (1994). Comparison of M and N gene sequences distinguishes variation amongst equine arteritis virus isolates. *J. Gen. Virol.*, **75**, 1491–1497.
14. CHO H.J., ENTZ S.C., DEREGT D., JORDAN L.T., TIMONEY P.J. & MCCOLLUM W.H. (2000). Detection of antibodies to equine arteritis virus by a monoclonal antibody-based blocking ELISA. *Can. J. Vet. Res.*, **64**, 38–43.
15. COOK R.F., GANN S.J. & MUMFORD J.A. (1989). The effects of vaccination with tissue culture-derived viral vaccines on detection of antibodies to equine arteritis virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Vet. Microbiol.*, **20**, 181–189.
16. CRAWFORD T.B. & HENSON J.B. (1973). Immunofluorescent, light microscopic and immunologic studies of equine viral arteritis. Proceedings of the Third International Conference on Equine Infectious Diseases, Paris, 1972. Karger, Basel, Switzerland, 282–302.
17. DEREGT D., DE VRIES A.A.F., RAAMSMAN M.J.B., ELMGREN L.D. & ROTTIER P.J.M. (1994). Monoclonal antibodies to equine arteritis virus identify the G_L protein as a target for virus neutralization. *J. Gen. Virol.*, **75**, 2439–2444.
18. DEL PIERO F. (2000). Equine viral arteritis. *Vet. Pathol.*, **37**, 287–296.

19. DOLL E.R., BRYANS J.T., WILSON J.C. & MCCOLLUM W.H. (1968). Immunisation against equine viral arteritis using modified live virus propagated in cell cultures of rabbit kidney. *Cornell Vet.*, **48**, 497–524.
20. EDWARDS S., CASTILLO-OLIVARES J., CULLINANE A., LABLE J., LENIHAN P., MUMFORD J.A., PATON D.J., PEARSON J.E., SINCLAIR R., WESTCOTT D.G.F., WOOD J.L.N., ZIENTARA S. & NELLY M. (1999). International harmonisation of laboratory diagnostic tests for equine viral arteritis. Proceedings of the Eighth International Conference on Equine Infectious Diseases, Dubai, UAE, 1998, 359–362.
21. FUKUNAGA Y., MATSUMURA T., SUGIURA T., WADA R., IMAGAWA H., KANEMARU T. & KAMADA M. (1994). Use of the serum neutralisation test for equine viral arteritis with different virus strains. *Vet. Rec.*, **136**, 574–576.
22. FUKUNAGA Y. & MCCOLLUM W.H. (1977). Complement fixation reactions in equine viral arteritis. *Am. J. Vet. Res.*, **38**, 2043–2046.
23. FUKUNAGA Y., WADA R., MATSUMURA T., ANZAI T., IMAGAWA H., SUGIURA T., KUMANOMIDO T., KANEMARU T. & KAMADA M. (1992). An attempt to protect against persistent infection of equine viral arteritis in the reproductive tract of stallions using formalin inactivated-virus vaccine. Proceedings of the Sixth International Conference on Equine Infectious Diseases, Cambridge, UK, 1991, 239–244.
24. FUKUNAGA Y., WADA R., MATSUMURA T., SUGIURA T. & IMAGAWA H. (1990). Induction of immune response and protection from equine viral arteritis (EVA) by formalin inactivated-virus vaccine for EVA in horses. *J. Vet. Med. (B)*, **37**, 135–141.
25. FUKUNAGA Y., WADA R., SUGITA S., FUJITA Y., NAMBO Y., IMAGAWA H., KANEMARU T., KAMADA M., KOMATSU N. & AKASHI H. (2000). *In vitro* detection of equine arteritis virus from seminal plasma for identification of carrier stallions. *J. Vet. Med. Sci.*, **62**, 643–646.
26. GERAHTY R.J., NEWTON J.R., CASTILLO-OLIVARES J., CARDWELL J.M. & MUMFORD J.A. (2003). Testing for equine arteritis virus. *Vet. Rec.*, **152**, 478.
27. GILBERT S.A., TIMONEY P.J., MCCOLLUM W.H. & DEREGT D. (1997). Detection of equine arteritis virus in the semen of carrier stallions using a sensitive nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2181–2183.
28. GLASER A.L., DE VRIES A.A.F. & DUBOVI E.J. (1995). Comparison of equine arteritis virus isolates using neutralizing monoclonal antibodies and identification of sequence changes in G_L associated with neutralization resistance. *J. Gen. Virol.*, **76**, 2223–2233.
29. HARRY T.O. & MCCOLLUM W.H. (1981). Stability of viability and immunising potency of lyophilised, modified equine arteritis live-virus vaccine. *Am. J. Vet. Res.*, **42**, 1501–1505.
30. HEDGES J.F., BALASURIYA U.B.R., SHABBI A., TIMONEY P.J., MCCOLLUM W.H., YILMA T. & MACLACHLAN N.J. (1998). Detection of antibodies to equine arteritis virus by enzyme linked immunosorbent assays utilizing G_L, M and N proteins expressed from recombinant baculoviruses. *J. Virol. Methods*, **76**, 127–137.
31. INIGUEZ P., ZIENTARA S., MARAULT M., MACHIN I. B., HANNANT D. & CRUCIERE C. (1998). Screening of horse polyclonal antibodies with a random peptide library displayed on phage: identification of ligands used as antigens in an ELISA test to detect the presence of antibodies to equine arteritis virus. *J. Virol. Methods*, **73**, 175–183.
32. JOHNSON B., BALDWIN C., TIMONEY P. & ELY R. (1991). Arteritis in equine fetuses aborted due to equine viral arteritis. *Vet. Pathol.*, **28**, 248–250.
33. JONES T.C., DOLL E.R. & BRYANS J.T. (1957). The lesions of equine viral arteritis. *Cornell Vet.*, **47**, 52–68.
34. KARBEN G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Path. u. Pharmacol.*, **162**, 480–483.
35. KONDO T., FUKUNAGA Y., SEKIGUCHI K., SUGIURA T. & IMAGAWA H. (1998). Enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey of equine arteritis virus in racehorses. *J. Vet. Med. Sci.*, **60**, 1043–1045.
36. LITTLE T.V., DEREGT D., MCCOLLUM W.H., & TIMONEY P.J. (1995). Evaluation of an immunocytochemical method for rapid detection and identification of equine arteritis virus in natural cases of infection. Proceedings of the Seventh International Conference on Equine Infectious Diseases, Tokyo, Japan, 1994, 27–31.

37. LOPEZ J.W., DEL PIERO F., GLASER A. & FINAZZI M. (1996). Immunoperoxidase histochemistry as a diagnostic tool for detection of equine arteritis virus antigen in formalin fixed tissues. *Equine Vet. J.*, **28**, 77–79.
38. LU Z., BRANSCUM A., SHUCK K.M., ZANG J., DUBOVI E., TIMONEY P.J. & BALASURIYA U.B.R. (2007). Detection of equine arteritis virus nucleic acid in equine semen and tissue culture fluid. *J. Vet. Diagn. Invest.*
39. MACLACHLAN N.J., BALASURIYA U.B., HEDGES J.F., SCHWEIDLER T.M., MCCOLLUM W.H., TIMONEY P.J., HULLINGER P.J. & PATTON J.F. (1998). Serologic response of horses to the structural proteins of equine arteritis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 229–236.
40. MACLACHLAN N.J., BALASURIYA U.B., ROSSITTO P.V., HULLINGER P.A., PATTON J.F. & WILSON W.D. (1996). Fatal experimental equine arteritis virus infection of a pregnant mare: immunohistochemical staining of viral antigens. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 367–374.
41. MCCOLLUM W.H. (1970). Vaccination for equine viral arteritis. Proceedings of the Second International Conference on Equine Infectious Diseases, Paris, 1969, Karger, Basle, Switzerland, 143–151.
42. MCCOLLUM W.H., PRICKETT M.E. & BRYANS J.T. (1971). Temporal distribution of equine arteritis virus in respiratory mucosa, tissues and body fluids of horses infected by inhalation. *Res. Vet. Sci.*, **2**, 459–464.
43. MCCOLLUM W.H. & SWERCZEK T.W. (1978). Studies of an epizootic of equine viral arteritis in racehorses. *J. Equine Med. Surg.*, **2**, 293–299.
44. MCCOLLUM W.H., TIMONEY P.J., ROBERTS A.W., WILLARD J.E. & CARSWELL G.D. (1988). Response of vaccinated and non-vaccinated mares to artificial insemination with semen from stallions persistently infected with equine arteritis virus. Proceedings of the Fifth International Conference on Equine Infectious Diseases, Lexington, 1987, University Press of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA, 13–18.
45. MCKINNON A.O., COLBERN G.C., COLLINS J.K., BOWEN R.A., VOSS J.L. & UMPHENOUR N.W. (1986). Vaccination of stallions with modified live equine viral arteritis virus. *J. Equine Vet. Sci.*, **6**, 66–69.
46. MOORE B.O. (1986). Development and evaluation of three equine vaccines. *Irish Vet. J.*, **40**, 105–107.
47. NEWTON J.R., GERAGHTY R.J., CASTILLO-OLIVARES J., CARDWELL M. & MUMFORD J.A. (2004). Evidence that use of an inactivated equine herpesvirus vaccine induces serum cytotoxicity affecting the equine arteritis virus neutralisation test. *Vaccine*, **22**, 4117–4123.
48. NUGENT J., SINCLAIR R., DEVRIES A.A.F., EBERHARDT R.Y., CASTILLO-OLIVARES J., DAVIS POYNTER N., ROTTIER P.J.M. & MUMFORD J.A. (2000). Development and evaluation of ELISA procedures to detect antibodies against the major envelope protein (G_L) of equine arteritis virus. *J. Virol. Methods*, **90**, 167–183.
49. OSTLUND E.N., PETERS J.C., STOKER A.M., MCCOLLUM, W.H. & TIMONEY P.J. (1997). Enhancement of cell culture growth of two arteriviruses by carboxymethyl cellulose overlay. Abstract. Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Louisville, Kentucky, USA, p. 33.
50. RAMINA A., DALLA VALLE L., DE MAS S., TISATO E., ZUIN A., RENIER M., CUTERI V., VALENTE C. & CANCELLOTTI F.M. (1999). Detection of equine arteritis virus in semen by reverse transcriptase polymerase chain reaction-ELISA. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **22**, 187–197.
51. SEKIGUCHI K., SUGITA S., FUKUNAGA Y., KONDO T., WADA R., KAMADA M. & YAMAGUCHI S. Detection of equine arteritis virus (EAV) by the polymerase chain reaction (PCR) and differentiation of EAV strains by restriction enzyme analysis of PCR products. *Arch. Virol.*, **140**, 1483–1491.
52. SENNE D.A., PEARSON J.E. & CABREY E.A. (1985). Equine viral arteritis: A standard procedure for the virus neutralisation test and comparison of results of a proficiency test performed at five laboratories. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, **89**, 29–34.
53. ST-LAURENT G., MORIN G. & ARCHAMBAULT D. (1994). Detection of equine arteritis virus following amplification of structural and nonstructural viral genes by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 658–665.
54. STADEJEK T., BJORKLUND H., BASCUNANA C.R., CIABATTI I.M., SCICLUNA M.T., AMADDEO D., MCCOLLUM W.H., AUTORINO G.L., TIMONEY P.J., PATON D.J., KLINGEBORN B. & BELAK S. (1999). Genetic diversity of equine arteritis virus. *J. Gen. Virol.*, **80**, 691–699.

55. STARICK E. (1998). Rapid and sensitive detection of equine arteritis virus in semen and tissue samples by reverse transcription-polymerase chain reaction, dot blot hybridisation and nested polymerase chain reaction. *Acta Virol.*, **42**, 333–339.
56. SZEREDI L., HORNYAK A., PALFI V., MOLNAR T., GLAVITS R. & DENES B. (2005). Study on the epidemiology of equine arteritis virus infection with different diagnostic techniques by investigating 96 cases of equine abortion in Hungary. *Vet. Microbiol.*, **108**, 235–242.
57. TIMONEY P.J., BRUSER C.A., MCCOLLUM W.H., HOLYOAK G.R. & LITTLE T.V. (2004). Comparative sensitivity of LLC-MK₂, RK-13, vero and equine dermis cell lines for primary isolation and propagation of equine arteritis virus. *In: Proceedings of the International Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection*, Timoney P.J., ed. M.H. Cluck Equine Research Center, 20–21 October 2004, Lexington, Kentucky, USA, pp 26–27.
58. TIMONEY P.J., FALLON L., MCCOLLUM W., SHUCK K., ZHANG J. & WILLIAMS N. (2006). The Outcome of Vaccinating Pregnant Mares with a Commercial Equine Arteritis Virus Vaccine. *J. Vet. Educ.*, doi 10.2746/095777307X217861.
59. TIMONEY P.J. & MCCOLLUM W.H. (1993). Equine viral arteritis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, **9**, 295–309.
60. TIMONEY P.J. & MCCOLLUM W.H. (2000). Equine viral arteritis: Further characterization of the carrier state in the stallion. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, **56**, 3–11.
61. TIMONEY P.J., UMPHENOUR N.W. & MCCOLLUM W.H. (1988). Safety evaluation of a commercial modified live equine arteritis virus vaccine for use in stallions. *Proceedings of the Fifth International Conference on Equine Infectious Diseases*, Lexington, 1987, University Press of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA, 19–27.
62. VAALA W.E., HAMIR A.N., DUBOVI E.J., TIMONEY P.J. & RUIZ B. (1992). Fatal congenitally acquired equine arteritis virus infection in a neonatal foal. *Equine Vet. J.*, **24**, 155–158.
63. WEBER H., BECKMANN K. & HAAS L. (2006). Fallbericht. Equines arteritisvirus (EAV) als aborterreger bei alpacas? *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, **113**, 162–163.
64. WESTCOTT D.G., KING D.P., DREW T.W., NOWOTNY N., KINDERMANN J., HANNANT D., BELAK S. & PATON D.J. (2003). Use of an internal standard in a closed one-tube RT-PCR for the detection of equine arteritis virus RNA with fluorescent probes. *Vet. Res.*, **34**, 165–176.
65. ZHANG J., MISZCZAK F., PRONOST S., FORTIER C., BALASURIYA U.B.R., ZIENTARA S., FORTIER G., & TIMONEY P.J. (2007). Genetic variation and phylogenetic analysis of 22 French isolates of equine arteritis virus. *Arch. Virol.*, doi 10.1007/s00705-007-1040-z.
66. ZHANG J., SHUCK K.M., MCCOLLUM W.H. & TIMONEY P.J. (2004). Comparison of virus isolation in cell culture and RT-PCR assays for detection of equine arteritis virus in cryopreserved semen. *In: Proceedings of the International Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection*, Timoney P.J., ed. M.H. Cluck Equine Research Center, 20–21 October 2004, Lexington, Kentucky, USA, pp 41–42.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de références de l'OIE pour l'artérite virale équine (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).

MORVE

RÉSUMÉ

*La morve est une maladie contagieuse et mortelle des chevaux, ânes et mulets due à l'infection par la bactérie *Burkholderia mallei* (sa dénomination, récemment modifiée, était *Pseudomonas pseudomallei* et elle avait été antérieurement classée dans les genres *Pfeifferella*, *Loefflerella*, *Malleomyces* ou *Actinobacillus*). La maladie entraîne la formation de nodules et d'ulcérations dans les voies respiratoires supérieures et les poumons. Elle provoque aussi des lésions cutanées, et la maladie est alors connue sous le nom de « farcin ». Le contrôle de la morve implique de réaliser un test à la malléine chez les équidés qui présentent des symptômes suspects et de séparer les sujets apparemment normaux des sujets réagissant, qui seront éliminés. La morve se transmet à l'homme et tout matériel infecté/contaminé ou potentiellement infecté/contaminé doit être analysé dans un laboratoire qui réponde aux exigences requises pour des agents pathogènes de classe 3.*

Identification de l'agent pathogène : des frottis de lésions récentes peuvent révéler la présence de bacilles ne prenant pas la coloration de Gram, non sporulés et non capsulés. La présence d'une structure périphérique évoquant une capsule a été démontrée par microscopie électronique. La bactérie est aérobique et préfère les milieux contenant du glycérol. À la différence des *Pseudomonas*, et de la bactérie étroitement apparentée *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* n'est pas mobile. Le cobaye est hautement sensible à l'infection, et si c'est absolument indispensable, les mâles peuvent être utilisés pour isoler le germe à partir d'un prélèvement très contaminé. Les kits d'identification par tests biochimiques que l'on trouve dans le commerce manquent de sensibilité. Il existe des tests employant des anticorps monoclonaux spécifiques, une amplification en chaîne par polymérase (PCR) et une PCR en temps réel. Ces derniers tests ont été aussi essayés au cours de récents foyers de morve.

Malléination et épreuves sérologiques : l'épreuve à la malléine (ou malléination) est un test sensible et spécifique de l'hypersensibilité à *Burkholderia mallei*. La malléine, une fraction protéique hydrosoluble de la bactérie, est injectée par voie sous-cutanée ou intradermo-palpébrale et peut être aussi déposée dans l'œil. Ceci provoque, chez les animaux infectés, un œdème cutané ou un gonflement nets de la paupière en 1 à 2 jours. La fixation du complément et la technique immuno-enzymatique (ELISA) sont les épreuves sérologiques les plus valables et les plus fiables pour le diagnostic. Une épreuve d'agglutination sur lame au Rose Bengale a été récemment développée en Russie, mais elle n'a été validée actuellement que dans ce pays.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : il n'existe pas de vaccins de la morve. Un dérivé protéique purifié de la malléine peut être actuellement acheté à l'Institut central de contrôle et de recherches vétérinaires (Central Veterinary Control and Research Institute), 06020, Etlik, Ankara (Turquie).

A. INTRODUCTION

La morve est une maladie bactérienne des ongulés périssodactyles, c'est-à-dire d'animaux possédant un nombre impair d'onglons, qui a un fort potentiel zoonotique et qui est connue depuis l'antiquité. Elle est la conséquence d'une infection par la bactérie *Burkholderia mallei* (sa dénomination, récemment modifiée, était *Pseudomonas pseudomallei* (45) et elle avait été antérieurement classée dans des genres variés comme *Pfeifferella*, *Loefflerella*, *Malleomyces* ou *Actinobacillus*). Des cas de morve peuvent survenir également chez des félidés sauvages vivant en liberté ou dans les parcs zoologiques. La sensibilité à la morve a été en outre démontrée chez les camélidés, l'ours, le loup et le chien. Les carnivores peuvent se contaminer en mangeant de la viande infectée, mais les bovins, ovins et porcins sont résistants (22). Les petits ruminants peuvent aussi être infectés au

contact étroit de chevaux morveux (42). Les formes aiguës de la maladie sont surtout décrites chez l'âne et le mulet qui présentent une fièvre élevée et une atteinte respiratoire (naseaux tuméfiés, dyspnée et pneumonie) ; la mort survient en quelques jours. Chez les chevaux, la morve s'exprime plutôt sous forme chronique, et ils peuvent survivre plusieurs années. Les animaux atteints de formes « occultes » chroniques et infracliniques constituent de dangereuses sources de contagio du fait d'un portage permanent ou intermittent de la bactérie (42).

Chez les chevaux, les nodules inflammatoires et les ulcères se développent sur les parois nasales, et provoquent un jetage jaune et collant. Ils s'accompagnent d'une adénite sous-maxillaire (nœuds lymphatiques durcis et hypertrophiés). Des cicatrices en étoile apparaissent après la guérison des ulcères. La formation d'abcès nodulaires dans les poumons s'accompagne d'une asthénie progressive, d'épisodes fébriles, de toux et de dyspnée. Une diarrhée et une polyurie peuvent aussi apparaître. Dans la forme cutanée (« farcin »), les vaisseaux lymphatiques sont tuméfiés (« cordes ») et des abcès nodulaires (« chancres ») de 0,5 à 2,5 cm se forment sur leur trajet, s'ulcèrent et laissent s'écouler un pus jaune et de consistance huileuse ou « huile de farcin ». Des nodules sont régulièrement retrouvés dans le foie et la rate. Le jetage et le pus huileux s'écoulant des voies respiratoires et des lésions cutanées sont infectieux. La transmission, facilitée par des contacts étroits entre les animaux, est généralement assurée par l'inhalation ou l'ingestion de matériel contaminé (par exemple aliments et abreuvoirs infectés) et par inoculation (par l'intermédiaire d'un harnais, par exemple). La période d'incubation peut varier de quelques jours à plusieurs mois (23, 42).

La morve est transmissible à l'homme par contact direct avec les animaux malades ou du matériel infecté/contaminé. La mortalité dans les cas aigus non traités peut atteindre 95 % dans les 3 semaines (25). Les malades peuvent quand même guérir s'ils sont traités rapidement et énergiquement par divers antibiotiques systémiques (17, 33). Une forme chronique avec abcès est aussi décrite (25). Les personnes appelées à manipuler des animaux suspects ou reconnus infectés, ou des objets souillés, doivent prendre des précautions rigoureuses pour ne pas se contaminer ou transmettre de la bactérie à d'autres équidés. Les prélèvements destinés au laboratoire doivent être emballés en tenant compte des consignes de sécurité, tenus au frais et transportés conformément au Chapitre 1.1.1., « Prélèvement et expédition des échantillons pour le diagnostic » de ce *Manuel terrestre*. Toutes les manipulations de matériel potentiellement infecté/contaminé doivent être effectuées dans un laboratoire qui réponde aux exigences de confinement pour des microbes pathogènes de classe 3, conformément aux indications présentées dans le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries », de ce *Manuel terrestre*.

La morve a été éradiquée de nombreux pays par des mesures associant le dépistage réglementaire et l'élimination des animaux infectés ainsi que des mesures de restriction à l'importation. Elle persiste dans quelques pays asiatiques, africains et sud-américains. Elle peut être considérée comme une maladie ré-émergente, qui peut être introduite en pays indemne par des animaux de compagnie ou des chevaux de course (26).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Le diagnostic clinique différentiel de la morve doit être fait avec les autres infections chroniques des muqueuses nasales ou des sinus, et avec la gourme (infection par *Streptococcus equi*), la lymphangite ulcéreuse (*Corynebacterium pseudotuberculosis*), la pseudotuberculose (*Yersinia pseudotuberculosis*) et la sporotrichose (*Sporotrichum* spp.). Les cas de morve doivent être clairement différenciés des cas suspects de lymphangite épizootique (causée par *Histoplasma farciminosum*) avec lesquels ils présentent de nombreuses similitudes cliniques. Chez l'homme, la morve doit être distinguée de la mélioïdose (infection par *B. pseudomallei*) qui est causée par une bactérie très proche de *B. mallei* (22).

a) Morphologie de *Burkholderia mallei*

Les bactéries sont assez nombreuses dans les étalements réalisés à partir de lésions récentes, mais peu abondantes dans les lésions plus anciennes (41). Elles peuvent être colorées au bleu de méthylène ou au mélange de Gram. Elles sont principalement en position extracellulaire et apparaissent sous forme de bâtonnets ne prenant pas la coloration de Gram, aux extrémités arrondies, de 2 à 5 µm de long et 0,3 à 0,8 µm de large, contenant des inclusions granulaires de tailles variées. Elles ont souvent une coloration irrégulière, n'ont pas de capsule visible au microscope ordinaire et ne forment pas de spores. La présence d'un revêtement ressemblant à une capsule a néanmoins été mise en évidence par microscopie électronique. Ce revêtement est composé de sucres neutres et sert à protéger la cellule bactérienne des facteurs défavorables du milieu. À la différence d'autres micro-organismes du groupe des *Pseudomonas*, et de son proche parent *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* ne possède aucun flagelle et n'est donc pas mobile (19, 31). Il est difficile d'affirmer la présence des micro-organismes dans les coupes de tissus, où ils peuvent avoir un aspect perlé (21). Leur aspect dépend de l'âge de la culture et du type de

milieu employé. Ils présentent un pléomorphisme accentué dans les vieilles cultures. Des filaments branchés se forment à la surface des cultures en bouillon (26).

b) Caractéristiques en cultures

Il vaut mieux tenter l'isolement à partir de lésions fermées non contaminées (21). Le micro-organisme est aérobic strict et anaérobic facultatif seulement en présence de nitrates (8, 19). Sa température optimale de croissance est de 37 °C (20). Il pousse bien, mais lentement, sur milieu ordinaire de culture, et 72 h d'incubation sont recommandées ; l'enrichissement en glycérol est particulièrement utile. Quelques jours d'incubation sur gélose au glycérol permettent d'obtenir des colonies de couleur légèrement crème, lisses, humides et visqueuses. En poursuivant l'incubation, les colonies sont plus épaisses et deviennent brun foncé et fermes. Le germe pousse bien aussi sur gélose-pomme de terre glycinée et en bouillon au glycérol, à la surface duquel se forme une pellicule visqueuse. La culture est beaucoup moins luxuriante sur gélose nutritive ordinaire, et la croissance est faible sur gélatine (34). Les cultures de *B. mallei* faites à partir de prélèvements recueillis dans des conditions non stériles sont régulièrement envahies par d'autres bactéries.

Pour éviter l'altération des caractères de la bactérie qui peuvent survenir *in vitro*, il faut réaliser les réactions d'identification à partir d'isolats récents. Le lait tournesolé est légèrement acidifié par *B. mallei*, et peut coaguler après une longue incubation. La bactérie réduit les nitrates. Bien que quelques auteurs aient écrit que le glucose était le seul glucide oxydé (lentement et de manière inconstante), d'autres ont montré que si un milieu et un indicateur appropriés étaient utilisés, le glucose et d'autres glucides comme l'arabinose, le galactose et le mannose étaient régulièrement fermentés par *B. mallei* (6). L'indole n'est pas produit, le sang de cheval n'est pas hémolysé et aucun pigment n'est diffusé dans les cultures (19). Un kit de diagnostic pour les tests de laboratoire disponible dans le commerce (par exemple le système API [Analytical Profile Index]: Analytab Products, BioMerieux ou Biolog [Hayward, California]) permet de confirmer facilement que la bactérie appartient au groupe *Pseudomonas*. Les systèmes actuellement en vente permettent rarement d'identifier avec certitude les espèces toujours plus nombreuses du genre *Burkholderia* (9). L'absence de mobilité du germe devient alors particulièrement importante à rechercher. Il existe un bactériophage spécifique de *B. mallei* (43).

Tous les milieux de culture préparés devraient être soumis à un contrôle de qualité de manière à vérifier qu'ils permettent effectivement la croissance du micro-organisme suspect à partir d'un faible inoculum. La souche de référence devrait être cultivée en parallèle avec les prélèvements suspects, afin de s'assurer de la fiabilité des épreuves.

L'ajout au milieu de substances inhibant la croissance des bactéries qui prennent la coloration de Gram (par exemple le cristal violet ou la proflavine) a prouvé son utilité lorsque les prélèvements sont contaminés, de même qu'un pré-traitement de ces prélèvements à la pénicilline (1 000 unités/ml pendant 3 h à 37 °C) (22). Un milieu sélectif a été élaboré (44), qui incorpore de la polymyxine E (1 000 unités), de la bacitracine (250 unités) et de l'actidione (0,25 mg) dans de la gélose nutritive (100 ml) contenant de la glycérine (4 %), du sérum d'âne ou de cheval (10 %), et de l'hémoglobine ovine ou de la gélose tryptone (0,1 %).

Hors de l'organisme, le micro-organisme est peu résistant à la dessiccation, à la chaleur, à la lumière ou aux produits chimiques, de sorte qu'il a peu de chances de survivre plus de deux semaines (25). Toutefois, dans des conditions favorables, il peut rester vivant quelques mois. *Burkholderia mallei* peut survivre dans l'eau du robinet pendant au moins un mois (34). Le chlorure de benzalkonium ou « roccal » (1/2 000), l'hypochlorite de sodium (500 ppm de chlore actif), l'iode, le chlorure de mercure en solution alcoolique, et le permanganate de potassium se sont avérés de très puissants désinfectants de *B. mallei* (20). Les désinfectants phénoliques sont moins actifs.

c) Inoculation à l'animal de Laboratoire

En cas de nécessité, le cobaye, le hamster et le chat ont été utilisés pour le diagnostic. Lorsque l'isolement chez l'animal de laboratoire est jugé indispensable, le matériel suspect est inoculé par voie intra-péritonéale à un cobaye mâle. Comme la sensibilité de cette technique n'est que de 20 %, il est conseillé d'inoculer au moins cinq animaux (25). L'inoculation d'un prélèvement infecté entraînera une sévère péritonite locale et une orchite (« signe de Strauss »). Le nombre de bactéries et leur virulence conditionnent la gravité des lésions. Lorsque le matériel étudié est fortement contaminé, il faut faire des passages supplémentaires (11). Le signe de Strauss n'est pas spécifique de la morve, et d'autres bactéries peuvent le provoquer. La spécificité de la réponse obtenue doit donc être confirmée par l'examen bactériologique des testicules infectés.

d) Confirmation par amplification en chaîne par polymérase (PCR) et PCR en temps réel

Plusieurs épreuves de PCR et de PCR en temps réel ont été proposées au cours de ces dernières années dans le but d'identifier *Burkholderia mallei* (2, 13, 32, 36, 38, 39), mais seule une épreuve de chaque ont été

évaluées lors d'un récent foyer de morve chez le cheval (30, 37). Ce sont ces deux épreuves qui seront décrites en détail ci-après, même si leur robustesse reste à démontrer par des essais inter-laboratoires. Les lignes directrices et les précautions figurant au 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* doivent être prises en compte.

- **Préparation de l'ADN**

Des colonies isolées sur gélose sont transférées dans 200 µl d'un tampon de lyse (5x tampon D [PCR Optimization Kit, Invitrogen, DeShelp, Pays-Bas, dilué au 1/5 en eau ultra-pure] ; 0.5 % de Tween 20 [ICI, American Limited, Merck, Hohenbrunn, Allemagne] ; 2 mg/ml de protéinase K [Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne] ; après incubation 1 heure à 56 °C et inactivation pendant 10 min à 95 °C, 2 et 4 µl du lysat clarifié sont utilisés comme échantillon, respectivement pour la PCR et pour la PCR en temps réel.

Quelques échantillons de tissus sont prélevés sur des chevaux (peau, foie, rate, poumon et conque auriculaire) inactivés dans le formol (48 h, 10 % v/v) puis découpés au scalpel en petits morceaux de 0,5 × 0,5 cm (environ 500 mg). Ces échantillons sont lavés deux fois en eau dé-ionisée (10 ml), incubés une nuit en solution saline stérile à 4 °C, puis broyés au pilon dans un mortier en présence d'azote liquide. L'ADN total est obtenu à partir de 50 mg de tissus avec le QIAamp Tissue KitTM, en suivant les instructions du fabricant (Qiagen, Hilden, Allemagne). L'ADN est élué avec 80 µl d'H₂O, dont 4 µl sont utilisés comme matrice.

- **Épreuve PCR (30)**

L'épreuve doit éventuellement être adaptée au protocole de PCR utilisé, avec quelques petites modifications concernant les paramètres du cycle la concentration des produits chimiques.

Les oligonucléotides employés par les auteurs cités en référence 30 ont été choisis sur la base des différences existantes entre les séquences *fliP* de *B. mallei* ATCC 23344^T (numéros d'accès NC_006350, NC_006351) et de *B. pseudomallei* K96243 (numéros d'accès NC_006348, NC_006349). Les amorces Bma-IS407-flip-f (5'-TCA-GGT-TTG-TAT-GTC-GCT-CGG-3') et Bma-IS407-flip-r (5'-CTA-GGT-GAA-GCT-CTG-CGC-GAG-3') sont employées pour amplifier un fragment de 989 pb. La PCR est réalisée avec 50 µl de mastermix (Eppendorf, Hamburg, Allemagne) prêt à l'emploi et 15 pmol de chaque amorce. Le thermo-cycleur est paramétré à 94 °C pour 30 s, 65 °C pour 30 s et 72 °C pour 60 s. Le cycle est repris 35 fois. Une étape finale d'élongation est ajoutée au processus (72 °C pendant 7 min). Les produits finaux sont observés en lumière ultra-violette après électrophorèse en gel d'agarose (1 % p/v en tampon TAE) et coloration au bromure d'éthidium. Des témoins dans lesquels l'échantillon est remplacé par de l'eau de qualité PCR et des témoins positifs contenant l'ADN de *B. mallei* seront introduits dans chaque cycle pour détecter la contamination par les amplicons des réactions précédentes ou pour détecter les échecs de l'amplification.

La limite inférieure de détection est de 10 fg, soit l'équivalent de deux génomes.

- **PCR en temps réel (37)**

L'épreuve doit éventuellement être adaptée à la PCR en temps réel utilisée, avec quelques petites modifications. C'est ainsi que les tubes du cycle doivent être choisis en fonction des recommandations du fabricant, et qu'il faut parfois doubler la concentration des oligonucléotides ou bien modifier le type de marquage des sondes. Les auteurs ont utilisé un système de PCR en temps réel MX3000PTM (Stratagene, Amsterdam, Pays-Bas) et des plaques à 96 trous (ThermoFast 96 ABGeneTM, Rapidozym, Berlin, Allemagne).

Les oligonucléotides employés par les auteurs cités en référence 37 ont été choisis sur la base des différences existantes entre les séquences *fliP* de *B. mallei* ATCC 23344^T (numéro d'accès NC_006350, NC_006351) et de *B. pseudomallei* K96243 (numéros d'accès NC_006348, NC_006349). La sonde fluorogénique est synthétisée avec du 6-carboxy-fluorescéine (FAM) à l'extrémité 5' et un black hole quencher 1 (BHQ1) à l'extrémité 3'. Les oligonucléotides utilisés sont Bma-flip-f (5'-CCC-ATT-GGC-CCT-ATC-GAA-G-3'), Bma-flip-r (5'-GCC-CGA-CGA-GCA-CCT-GAT-T-3') et la sonde Bma-flip (5'-6FAM-CAG-GTC-AAC-GAG-CTT-CAC-GCG-GAT-C-BHQ1-3').

Le mélange réactionnel de 25 µl est constitué de 12,5 µl 2× TaqManTM Universal MasterMix (Applied Biosystems, Foster City, Etats-Unis d'Amérique), 0,1 µl de chaque amorce (10 pmol/µl), 0,1 µl de la sonde (10 mol/µl) et 4 µl d'échantillon. Le thermo-cycleur est paramétré à 50 °C pendant 2 min ; 95 °C pendant 10 min ; 45 (50) cycles à 95 °C pendant 25 s et 63 °C pendant 1 min. Les contaminants possibles, constitués par les produits d'amplification des réactions précédentes, sont inactivés au cours d'une étape d'incubation initiale utilisant l'uracile N'-glycosylase.

Les auteurs suggèrent d'inclure un témoin interne d'inhibition constitué par un gène cible du bactériophage lambda (Lambda-F [5'-ATG-CCA-CGT-AAG-CGA-AAC-A-3] Lambda-R [5'-GCA-TAA-ACG-AAG-CAG-TCG-AGT-3']), Lam-YAK [5'-YAK-ACC-TTA-CCG-AAA-TCG-GTA-CGG-ATA-CCG-C-DB-3']), qui peut être titré pour déterminer les valeurs limites reproductibles du cycle. Toutefois, selon les prélèvements à analyser, un gène d'expression ubiquitaire peut aussi être utilisé en plus ou de manière alternative. Des témoins dans lesquels l'échantillon est remplacé par 4 µl d'eau de qualité PCR et des témoins positifs contenant l'ADN de *B. mallei* doivent être introduits dans chaque cycle pour détecter la contamination par les amplicons ou les échecs de l'amplification.

L'échelle linéaire de l'épreuve a été calculée de manière à couvrir toutes les concentrations, de 240 pg à 70 fg de l'ADN bactérien/réaction. La limite inférieure de détection, définie comme la plus petite quantité d'ADN toujours détectable lors de trois cycles comportant huit mesures chacun, est de 60 fg d'ADN soit l'équivalent de quatre génomes (au seuil de probabilité 95 %). Pour chacune des réactions respectives, la variabilité intra-essai de l'épreuve PCR *fliP* pour 35 pg d'ADN/réaction est de 0,68 % (basée sur les valeurs Ct) et elle est de 1,34 % pour 875 fg d'ADN/réaction. La variabilité inter-essai est respectivement pour chaque réaction de 0,89 % (basée sur les valeurs Ct) pour 35 pg d'ADN/réaction et de 2,76 % pour 875 fg d'ADN/réaction.

e) Autres méthodes

Le génome de la souche type ATCC 23344^T de *Burkholderia mallei* a été séquencé en 2004 (27). Plusieurs génomes d'autres isolats l'ont été également par la suite, révélant une grande plasticité génétique. Les passages sur différentes espèces hôtes ou sur différents milieux de culture peuvent altérer considérablement les séquences génomiques (29). La perte, par mutation, de la capacité de produire les LPS et/ou les polysaccharides capsulaires suite à des passages successifs de la bactérie en culture est bien connue ; elle se traduit par une virulence réduite, voire nulle, et elle a une influence sur les réactions sérologiques (26). Plusieurs techniques de typage moléculaire ont été développées avec succès. De simples techniques moléculaires comme la PCR - Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (35) et l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (5) peuvent être utilisées pour mieux caractériser les isolats. Le ribotypage de 25 isolats de *B. mallei* faisant appel aux enzymes de restriction *Pst*I et *Eco*RI en association avec une sonde *E. coli* 18-mer rADN a révélé l'existence de 17 sérotypes distincts (12). Ces techniques restent encore réservées à certains laboratoires spécialisés, parce qu'elles doivent faire appel à une collection très importante de souches. Le typage séquentiel multiloculaire (MLST) est réalisable avec de l'ADN purifié, ce qui évite d'avoir trop de cultures bactériennes en cours ou de devoir entretenir des souches de collection. Une analyse basée sur des données disponibles sur internet peut même faciliter les diagnostics (10). Aucune caractéristique spécifique des lésions causées par *B. mallei* ne peut être décrite au plan anatomopathologique. Des sérums hyperimmuns de lapin spécifiques de *B. mallei* peuvent être utilisés pour l'analyse immunohistochimique.

2. Malléination et épreuves sérologiques

a) La malléination (Épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Le dérivé protéique purifié (PPD pour *Purified Protein Derivative*) de la malléine, qui est disponible sur le marché, est une solution de fractions protéiques solubles dans l'eau obtenues en traitant *B. mallei* par la chaleur. L'épreuve repose sur la détection de l'hypersensibilité à la malléine des chevaux infectés. Des résultats peu concluants peuvent être observés dans les formes cliniques avancées chez les chevaux et les formes aiguës chez les ânes, nécessitant le recours à des méthodes de diagnostic complémentaires (1).

- **Le test intradermo-palpébral**

C'est l'épreuve la plus sensible, la plus fiable et la plus spécifique de détection de la morve chez les ongulés périssodactyles (solipèdes) infectés, et il a largement supplanté les tests ophtalmiques et sous-cutanés (3). Un volume de 0,1 ml de malléine PPD concentrée est injecté par voie intradermique dans la paupière inférieure, et la réaction est recherchée 24 h et 48 h après. Une réaction positive est caractérisée par un œdème marqué de la paupière, éventuellement accompagné d'un écoulement purulent du cul-de-sac conjonctival ou de la conjonctive. Cette réaction locale est habituellement accompagnée d'une élévation de la température. Lorsque la réaction est négative, on ne constate habituellement aucun changement, ou tout au plus un léger gonflement de la paupière inférieure.

- **Le test ophtalmique**

Ce test est moins fiable que le test intradermo-palpébral. Quelques gouttes de malléine sont déposées dans l'œil au niveau du cul-de-sac conjonctival. Chez un animal infecté, on observe habituellement un gonflement des paupières s'étendant parfois sur la joue, éventuellement associé à un léger écoulement oculaire. La réaction peut également se produire, mais moins marquée, sur l'œil opposé.

- **L'épreuve sous-cutanée**

Cette épreuve interfère avec le diagnostic sérologique et on lui préfère donc les deux méthodes de malléination précédentes, d'autant plus qu'elle peut ne pas être autorisée dans certains pays. La température du cheval doit être inférieure à 38,8 °C le jour précédant l'épreuve, au moment de l'injection, et 9, 12 et 15 h après l'injection. Une zone de peau de 10 cm² est tondue et désinfectée au milieu de l'encolure; 2,5 ml de malléine diluée sont injectés par voie sous-cutanée au centre de cette zone. Lorsque le test est positif, la température du cheval s'élève à 40,0 °C (104°F) ou au-dessus pendant les 15 premières heures, et une tuméfaction ferme et douloureuse à bords surélevés se développe dans les 24 h au site de l'injection. Chez les chevaux non infectés, on n'observe aucune réaction locale, ou seulement un petit œdème local et transitoire. En cas de réaction douteuse, l'épreuve peut être recommencée 14 jours plus tard avec une double dose de malléine.

b) Épreuve de la fixation du complément (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Bien qu'elle ne soit pas aussi sensible que la malléination, l'épreuve de la fixation du complément (FC) constitue un test sérologique valable, qui a été utilisé durant de nombreuses années pour diagnostiquer la morve (3). Ce test est considéré comme fiable à 90-95 %, la réaction sérologique devenant positive moins d'une semaine après l'infection et le demeurant en cas de réveil du processus chronique (34). Toutefois, sa spécificité a été récemment mise en doute (26).

- **Préparation de l'antigène (16)**

- Des flacons contenant un bouillon de viande additionné de 3 % de glycérol sont inoculés avec une culture de *B. mallei* en phase de croissance exponentielle et incubés à 37 °C pendant 8 à 12 semaines ;
- Les cultures sont inactivées en exposant les flacons à la vapeur naissante (100 °C) pendant 60 min ;
- Le surnageant clair est décanté et filtré. Le filtrat est de nouveau plongé 75 min dans un bain de vapeur, pendant trois jours consécutifs, et clarifié par centrifugation ;
- Le produit clarifié est concentré au dixième de son volume original par évaporation dans un bain de vapeur ou d'eau chaude ;
- L'antigène concentré est versé dans des flacons de verre brun afin d'être protégé de la lumière, et conservé à 4 °C. Il a été démontré que l'antigène, une fois concentré, restait stable pendant au moins 10 ans ;
- Les lots d'antigène sont préparés en diluant l'antigène concentré au 1/20^e dans une solution saline stérile contenant 0,5 % de phénol. L'antigène dilué est réparti dans des ampoules de verre brun et stocké à 4 °C. La dilution finale de travail est déterminée par un titrage en échiquier. La dilution finale se fait extemporanément, au moment de la réalisation de la FC ;

L'antigène préparé est principalement un lipopolysaccharide (LPS). Une technique alternative de préparation de l'antigène consiste à employer des cultures jeunes : l'agent est mis en culture pendant 12 h sur des géloses inclinées glycinées, qui sont ensuite rincées avec une solution saline. La suspension obtenue est chauffée pendant 1 h à 70 °C et c'est cette suspension bactérienne chauffée qui est utilisée comme antigène. L'inconvénient de cette méthode de préparation de l'antigène est qu'il contient tous les composants cellulaires de la bactérie. L'innocuité de la préparation antigénique doit être contrôlée par sa mise en culture sur gélose au sang.

- **Protocole (24)**

- Le sérum est dilué au 1/5 dans du tampon véronal (barbiturique) salin contenant 0,1 % de gélatine ou du diluant pour fixation du complément (CFD pour *Complement Fixation Diluent* – disponible en comprimés) sans gélatine ;
- Le sérum dilué est inactivé pendant 30 min à 56 °C. Dans le protocole de FC utilisé par le Département de l'Agriculture des États-Unis (USDA), l'inactivation dure 35 min (24). Le sérum des équidés autres que des chevaux doit être inactivé à 63 °C pendant 30 min ;
- Des dilutions de 2 en 2 des sérums sont préparées dans des plaques de microtitrage à 96 trous à fond arrondi ;
- Le complément de cobaye est dilué dans le tampon choisi ; 5 (ou éventuellement 4) unités de complément lysant 50 % des globules rouges (CH₅₀) sont employées ;
- Les sérums, le complément et l'antigène sont répartis dans les plaques et incubés pendant 1 h à 37 °C (Il on peut aussi laisser la plaque à 4 °C pendant une nuit) ;

- vi) On ajoute une suspension de globules rouges de moutons à 2 %, lavés et sensibilisés. Dans le protocole du Département de l'Agriculture des États-Unis les réactions positives doivent être confirmées dans un tube à essai contenant des globules rouges de moutons à 3 % (24).
- vii) Les plaques sont incubées pendant 45 min à 37 °C, et ensuite centrifugées pendant 5 min à 600 g.

Une hémolyse de 100 % à la dilution du 1/5 est considéré comme un résultat négatif. Le résultat est douteux si on observe 25 à 75 % d'hémolyse, et il est positif si aucune hémolyse (100 % de fixation) n'est observée à cette même dilution du sérum analysé. Malheureusement, des résultats faussement positifs peuvent se produire, et *B. pseudomallei* et *B. mallei*, qui présentent des réactions croisées, ne peuvent être différenciés par sérologie (3, 25). Des chevaux sains peuvent aussi présenter une réaction de FC faussement positive pendant une période variable après une malléation par voie intradermique.

c) Épreuve immuno-enzymatique

Des épreuves immuno-enzymatiques (ELISA) en plaque et sur membrane (blot) ont été utilisées dans le diagnostic sérologique de la morve, mais aucun de ces procédés n'a permis de différencier sérologiquement *B. mallei* et *B. pseudomallei*. Des tentatives de détection des anticorps basées sur leur interaction avec un antigène fixé sur un support ont été réalisées en imprégnant une zone délimitée de languettes (ou de bâtonnets) avec les antigènes (« *antigen-dotted dipsticks* ») ensuite immergées dans le liquide contenant les anticorps ou par western blot en faisant appel à des antigènes préalablement séparés par électrophorèse et transférés sur un support (14, 40). Un ELISA de compétition utilisant un anticorps monoclonal anti-polysaccharide non caractérisé a aussi été développé, et il s'est montré aussi performant que la FC (15). Le développement permanent de réactifs anticorps monoclonaux spécifiques des antigènes de *B. mallei* est très prometteur pour la mise au point prochaine de tests ELISA plus spécifiques, qui aideront à résoudre les résultats incertains des épreuves pratiquées pendant la quarantaine des chevaux importés (4, 7, 18, 25). Actuellement, aucun de ces tests n'a été validé.

d) Autres épreuves sérologiques

Un dot-ELISA avidine-biotine a été décrit (40), mais n'a pas encore été très utilisé, ni validé. L'antigène est constitué d'une culture bactérienne inactivée par la chaleur qui a été concentrée et purifiée. Une petite tache de cet antigène est ensuite déposée sur une languette de nitrocellulose (dipstick) qui est utilisée pour rechercher la présence d'anticorps contre *B. mallei* dans le sérum équin. L'épreuve peut être réalisée en une heure environ, en utilisant les dipsticks pré-bloqués sur lesquels a été déposé l'antigène. Du sérum ou du sang total peut être utilisé dans cette épreuve, et une hémolyse partielle ne donne aucune coloration de fond dans la zone de nitrocellulose imprégnée par l'antigène. Une nouvelle technique à puce ADN (microarray) utilisant le lipopolysaccharide, semblerait prometteuse car plus sensible (28).

Une épreuve d'agglutination sur lame au Rose Bengale (RBT pour *Rose Bengal plate agglutination Test*) a été décrite pour le diagnostic sérologique de la morve chez le cheval et autres animaux sensibles ; cette épreuve n'a été validée qu'en Russie. L'antigène utilisé est une suspension bactérienne inactivée par la chaleur et colorée avec du Rose Bengale.

La validité des autres épreuves d'agglutination et de précipitation n'est pas suffisamment établie pour qu'elles soient employées dans des programmes de contrôle. Les analyses réalisées sur des chevaux atteints de morve chronique et des chevaux en mauvais état donnent des résultats négatifs, ou ininterprétables.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'existe pas de vaccin contre la morve.

La malléine PPD pour usage intradermo-palpébral et ophtalmique est produite et commercialisée par l'Institut central de contrôle et de recherches vétérinaires (Central Veterinary Control and Research Institute), 06020, Etlik, Ankara (Turquie).

C'est l'institut ID-Lelystad en Hollande qui a fourni les informations suivantes sur les spécifications relatives à la malléine PPD.

1. Gestion des semences bactériennes

Trois souches de *Burkholderia mallei* sont utilisées dans la production de la malléine PPD, à savoir la souche Bogor (originale d'Indonésie), la souche Mukteswar (Inde) et la souche Zagreb (Croatie). Le matériel de semence est représenté par un stock de cultures lyophilisées. Les souches sont cultivées sur gélose au glycérol à 37 °C pendant 1 à 2 jours. Elles peuvent être passées sur cobayes afin de maintenir leur virulence et leur pouvoir antigène.

2. Méthode de fabrication

Le milieu de Dorset & Henley, enrichi d'oligo-éléments, est employé pour la production de la malléine PPD. Ce milieu est inoculé avec une suspension épaisse en solution saline du produit de raclage d'une culture de *B. mallei* sur gélose glycinée. Le milieu de production est incubé à 37 °C pendant environ 10 semaines. Les bactéries sont ensuite tuées par action de la vapeur pendant 3 h dans un stérilisateur de Koch. Le liquide est alors filtré sur une couche d'ouate pour éliminer les amas bactériens. Le liquide trouble ainsi obtenu est clarifié par filtration sur membrane, et une partie d'acide trichloracétique à 40 % est immédiatement ajoutée à 9 parties de filtrat de culture. Après une nuit de repos, il se produit un précipité clair brun-grisâtre.

Le liquide surnageant, prélevé à la pipette, est éliminé. Le précipité est centrifugé 15 min à 2 500 **g** et le culot est lavé au moins trois fois dans une solution de NaCl à 5 %, pH 3, jusqu'à ce que le pH atteigne 2,7. Le précipité est dissous par agitation dans un minimum de solvant alcalin. Le liquide est brun foncé et doit avoir un pH de 6,7. Cette malléine concentrée doit être longuement centrifugée et le surnageant dilué avec une quantité égale d'une solution glucosée tamponnée. Avant qu'il soit réparti en ampoules et lyophilisé, la teneur en protéines du produit est évaluée par la méthode de Kjeldahl.

3. Contrôles en cours de fabrication

Les flacons sont fréquemment observés en cours d'incubation, afin de déceler toute contamination éventuelle et les flacons suspects sont écartés. Une culture typique de *B. mallei* se caractérise par un trouble et un sédiment. Il se produit aussi une légère culture en surface, dont une partie a tendance à couler, et un anneau orangé bien visible se forme sur ses bords.

4. Contrôle des lots

Chaque lot de malléine PPD subit un contrôle portant sur sa stérilité, son innocuité, les agents de conservation, sa teneur en protéines et son activité.

Les épreuves de stérilité sont exécutées selon les directives de la Pharmacopée Européenne.

Les contrôles d'innocuité sont réalisés sur 5 à 10 chevaux en bonne santé, qui sont soumis à une malléination intradermo-palpébrale. L'œdème qui en résulte au point d'inoculation doit être, sinon nul, du moins à peine détectable et transitoire et il ne doit être accompagné d'aucun écoulement conjonctival.

Les préparations auxquelles du phénol a été ajouté comme agent de conservation ne doivent pas contenir plus de 0,5 % (p/v) de ce produit. La teneur en protéines ne doit pas être inférieure à 0,95 mg/ml, ni supérieure à 1,05 mg/ml.

Les contrôles d'activité sont effectués sur des cobayes et des chevaux. Les animaux sont sensibilisés par inoculation sous-cutanée d'une suspension concentrée dans de l'huile de paraffine ou de l'adjuvant incomplet de Freund de *B. mallei* tuées par la chaleur. Des bovins peuvent aussi être utilisés à la place des chevaux. Le lot de production est comparé à une malléine PPD de référence, les doses de 0,1 ml injectées par voie intradermique étant administrées de manière totalement aléatoire.

Chez les cobayes, les différentes zones d'érythème sont mesurées après 24 h. Chez les chevaux, l'augmentation de l'épaisseur de la peau est mesurée avec un cutimètre (pied à coulisse). Les résultats sont évalués statistiquement, en utilisant des méthodes statistiques de régression du parallélisme.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALLEN H. (1929). The diagnosis of glanders. *J. R. Army Vet. Corps*, **1**, 241–245.
2. BAUERNFEIND A., ROLLER C., MEYER D., JUNGWIRTH R. & SCHNEIDER I. (1998). Molecular procedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2737–2741.
3. BLOOD D.C. & RADOSTITS O.M. (1989). Diseases caused by bacteria. *In: Veterinary Medicine, Seventh Edition*. Balliere Tindall, London, UK, 733–735.
4. BURTNICK M.N., BRETT P.J. & WOODS D.E. (2002). Molecular and physical characterization of *Burkholderia mallei* O antigens. *J. Bacteriol.*, **184**, 849–852.
5. CHANTRATITA N., VESARATCHAVEST M., WUTHIEKANUN V., TIYAWISITSRI R., ULZIITOGTOKH T., AKCAY E., DAY N.P. & PEACOCK S.J. (2006). Pulsed-field gel electrophoresis as a discriminatory typing technique for the biothreat agent *Burkholderia mallei*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **74**, 345–347.
6. EVANS D. (1966). Utilization of carbohydrates by *Actinobacillus mallei*. *Can. J. Microbiol.*, **12**, 625–639.
7. FENG S.H., TSAI S., RODRIGUEZ J., NEWSOME T., EMANUEL P. & LO S.C. (2006). Development of mouse hybridomas for production of monoclonal antibodies specific to *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Hybridoma* (Larchmt), **25**, 193–201.
8. GILARDI G.L. (1985). Pseudomonas. *In: Manual of Clinical Microbiology, Fourth Edition*, Lenette E.H., Bulawo A., Hausler W.J. & Shadomy H.J., eds. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 350–372.
9. GLASS M.B. & POPOVIC T. (2005). Preliminary evaluation of the API 20NE and RapID NF plus systems for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 479–483.
10. GODOY D., RANDLE G., SIMPSON A.J., AANENSEN D.M., PITT T.L., KINOSHITA R. & SPRATT B.G. (2003). Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2068–2079.
11. GOULD J.C. (1950). Mackie and McCartney's Handbook of Bacteriology, Eighth Edition, Cruickshank R., ed. E. & S. Livingstone, Edinburgh, UK, 391–394.
12. HARVEY S.P. & MINTER J.M. (2005). Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **44**, 91–97.
13. LEE M.A., WANG D. & YAP E.H. (2005). Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **43**, 413–417.
14. KATZ J.B., CHIEVES., HENNAGER S.G., NICHOLSON J.M., FISHER T.A. & BYERS P.E. (1999). Serodiagnosis of equine piroplasmosis, dourine and glanders using an arrayed immunoblotting method. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 292–294.
15. KATZ J., DEWALD R. & NICHOLSON J. (2000). Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum*, and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 46–50.
16. KELSER R.A. & REYNOLDS F.H.K. (1935). Special veterinary laboratory methods, complement fixation test for glanders. *In: Laboratory Methods for the United States Army*, Simons J.S. & Gantzkow C.J., eds. Lea and Febiger, Philadelphia, USA, 973–987.
17. KHAN A.S. & ASHFORD D.A. (2001). Ready or not – Preparedness for bioterrorism. *New Engl. J. Med.*, **345**, 287–289.
18. KHRAPOVA N.P., TIKHONOV N.G., PROKHVATILOVA E.V. & KULAKOV M.I. (1995). The outlook for improving the immunoglobulin preparations for the detection and identification of the causative agents of glanders and melioidosis. *Med. Parazitol.*, **4**, 49–53.

19. KRIEG N.R. & HOLT J.G., EDS (1984). Gram-negative aerobic rods and cocci. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, USA & London, UK, 174–175.
20. MAHADERAN S., DRAVIDAMANI S. & DARE B.J. (1987). Glanders in horses. *Centaurus*, **III**, 135–138.
21. MILLER W., PANNEL L., CRAVITZ L., TANNER A. & INGALLS M. (1948). Studies on certain biological characteristics of *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei* I. Morphology, cultivation, viability, and isolation from contaminated specimens. *J. Bacteriol.*, **55**, 115–126.
22. MINETT F.C. (1959). Glanders (and melioidosis). *In: Infectious Diseases of Animals*. Vol. 1. Diseases due to Bacteria, Stableforth A.W. & Galloway I.A., eds. Butterworths Scientific Publications, London, UK, 296–309.
23. MONLUX W.S. (1984). Diseases affecting food and working animals. *In: Foreign Animal Diseases*. United States Department of Agriculture, US Government Printing Office, Washington DC, USA, 178–185.
24. NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES (2006). Complement Fixation Test for Detection of Antibodies to *Burkholderia mallei* – Microtitration Test. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.
25. NEUBAUER H., FINKE E.-J. & MEYER H. (1997). Human glanders. *International Review of the Armed Forces Medical Services*, **LXX**, **10/11/12**, 258–265.
26. NEUBAUER H., SPRAGUE L.D., ZACHARIA R., TOMASO H., AL DAHOUK S., WERNERY R., WERNERY U. & SCHOLZ H.C. (2005). Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.*, **52**, 201–205.
27. NIERMAN W.C., DESHAZER D., KIM H.S., TETTELIN H., NELSON K.E., FELDBLYUM T., ULRICH R.L., RONNING C.M., BRINKAC L.M., DAUGHERTY S.C., DAVIDSEN T.D., DEBOY R.T., DIMITROV G., DODSON R.J., DURKIN A.S., GWINN M.L., HAFT D.H., KHOURI H., KOLONAY J.F., MADUPU R., MOHAMMOUD Y., NELSON W.C., RADUNE D., ROMERO C.M., SARRIA S., SELENGUT J., SHAMBLIN C., SULLIVAN S.A., WHITE O., YU Y., ZAFAR N., ZHOU L. & FRASER C.M. (2004). Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 14246–14251.
28. PARTHASARATHY N., DESHAZER D., ENGLAND M. & WAAG D.M. (2006). Polysaccharide microarray technology for the detection of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* antibodies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **56**, 329–332.
29. ROMERO C.M., DESHAZER D., FELDBLYUM T., RAVEL J., WOODS D., KIM H.S., YU Y., RONNING C.M. & NIERMAN W.C. (2006). Genome sequence alterations detected upon passage of *Burkholderia mallei* ATCC 23344 in culture and in mammalian hosts. *BMC Genomics*, **5**:7, 228.
30. SCHOLZ H.C., JOSEPH M., TOMASO H., AL DAHOUK S., WITTE A., KINNE J., HAGEN R.M., WERNERY R., WERNERY U. & NEUBAUER H. (2006). Detection of the reemerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliP-based polymerase chain reaction assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **54**, 241–247.
31. SPRAGUE L.D. & NEUBAUER H. (2004). A review on animal melioidosis with special respect to epizootologie, clinical presentation and diagnostics. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, **51**, 305–320.
32. SPRAGUE L.D., ZYSK G., HAGEN R.M., MEYER H., ELLIS J., ANUNTAGOOL N., GAUTHIER Y. & NEUBAUER H. (2002). A possible pitfall in the identification of *Burkholderia mallei* using molecular identification systems based on the sequence of the flagellin fliC gene. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **34**, 231–236.
33. SRINIVASAN A., KRAUS C.N., DESHAZER D., BECKER P.M., DICK J.D., SPACEK L., BARTLETT J.G., BYRNE W.R. & THOMAS D.L. (2001). Glanders in a military research microbiologist. *New Engl. J. Med.*, **345**, 256–258.
34. STEELE J.H. (1980). Bacterial, rickettsial and mycotic diseases. *In: CRC Handbook Series in Zoonoses*, Section A, Vol. I, Steele J.H., ed. CRC Press, Boca Raton, USA, 339–351.
35. TANPIBOONSAK S., PAEMANEE A., BUNYARATAPHAN S. & TUNGPRADABKUL S. (2004). PCR-RFLP based differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Mol. Cell. Probes.*, **18**, 97–101.

36. THIBAUT F.M., VALADE E. & VIDAL D.R. (2004). Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5871–5874.
37. TOMASO H., SCHOLZ H.C., AL DAHOUK S., EICKHOFF M., TREU T.M., WERNERY R., WERNERY U. & NEUBAUER H. (2006). Development of a 5'-nuclease real-time PCR assay targeting flhP for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. *Clin. Chem.*, **52**, 307–310.
38. ULRICH M.P., NORWOOD D.A., CHRISTENSEN D.R. & ULRICH R.L. (2006). Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. *J. Med. Microbiol.*, **55**, 551–559.
39. U'REN J.M., VAN ERT M.N., SCHUPP J.M., EASTERDAY W.R., SIMONSON T.S., OKINAKA R.T., PEARSON T. & KEIM P. (2005). Use of a real-time PCR TaqMan assay for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5771–5774.
40. VERMA R.D., SHARMA J.K., VENKATESWARAN K.S. & BATRA H.V. (1990). Development of an avidin-biotin dot enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with other serological tests for diagnosis of glanders in equines. *Vet. Microbiol.*, **25**, 77–85.
41. WILSON G.S. & MILES A.A. (1964). Glanders and melioidosis. In: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. E. Arnold, London, UK, 1714–1717.
42. WITTIG M.B., WOHLSEIN P., HAGEN R.M., AL DAHOUK S., TOMASO H., SCHOLZ H.C., NIKOLAOU K., WERNERY R., WERNERY U., KINNE J., ELSCHNER M. & NEUBAUER H. (2006). Glanders--a comprehensive review. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, **113**, 323–230.
43. WOODS D.E., JEDDELOH J.A., FRITZ D.L. & DESHAZER D. (2002). *Burkholderia thailandensis* E125 harbors a template bacteriophage specific for *Burkholderia mallei*. *J. Bacteriol.*, **184**, 4003–4017.
44. XIE X., XU F., XU B., DUAN X. & GONG R. (1980). A New Selective Medium for Isolation of Glanders Bacilli. Collected papers of veterinary research. Control Institute of Veterinary Biologics, Ministry of Agriculture, Peking, China (People's Rep. of), **6**, 83–90.
45. YABUCHI E., KOSAKO Y., OYAZU H., YANO I., HOTTA H., HASHIMOTO Y., EZAKI T. & ARAKAWA M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.*, **36**, 1251–1275.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la Morve (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)

CHAPITRE 2.5.12.

GALE DES ÉQUIDÉS

Se reporter au Chapitre 2.9.8. Gales.

*
* *

CHAPITRE 2.5.13.

VARIOLE ÉQUINE

Il n'y a pas de chapitre actuellement disponible sur la variole équine.

*
* *

ENCÉPHALOMYÉLITE ÉQUINE VÉNÉZUÉLIENNE

RÉSUMÉ

Les virus de l'encéphalomyélite équine vénézuélienne (EEV), du genre Alphavirus de la famille Togaviridae, sont la cause de zoonoses affectant l'homme et les équidés, chez lesquels la maladie peut s'exprimer aussi bien sous la forme d'une réaction fébrile modérée que celle d'une encéphalite mortelle. Ils sont transmis par des insectes hématophages et, en tout premier lieu, des moustiques mammalophiles.

Le complexe des virus de l'EEV comprend 6 sous-types antigéniques (I-VI). Au sein du sous-type I, on distingue 5 variants antigéniques (variants AB-F). Les sous-types I-A et I-B initialement considérés comme deux variants différents, constituent aujourd'hui un seul et même variant nommé I-AB. Les variants I-AB et I-C sont associés à des épizooties chez les équidés et des épidémies chez les humains. De graves flambées sont décrites dans l'histoire qui sont à l'origine de milliers de cas humains et équins. Les 3 autres variants du sous-type I (I-D, I-E, I-F) et les 5 autres sous-types (II-VI) sont associés à des cycles enzootiques naturels. Les équidés sont les hôtes des souches épizootiques d'EEV dans les cycles d'amplification, tandis que les virus enzootiques circulent en premier lieu chez les rongeurs selvatiques et les moustiques. Ces variants et sous-types enzootiques ont été considérés comme non pathogènes pour les équidés, mais ils peuvent causer une maladie clinique chez l'homme. Des foyers limités d'encéphalite causés par des variants enzootiques I-E ont toutefois été décrits en 1993 et 1996 au Mexique.

Identification de l'agent pathogène : *Le diagnostic d'une infection par le virus de l'EEV peut être confirmé par l'isolement, l'identification, et le classement antigénique du virus isolé.*

Un diagnostic présomptif d'encéphalomyélite équine peut être porté dans des régions tropicales ou subtropicales, en période d'activité des insectes hématophages, lorsque des animaux sensibles présentent des signes d'encéphalomyélite. Le virus de l'EEV peut être isolé en culture de cellules ou sur animaux de laboratoire à partir du sang ou du sérum provenant d'animaux fébricitants dans les premières phases de l'infection. Il est moins fréquemment obtenu à partir du sang ou du tissu cérébral des sujets présentant des symptômes d'encéphalite.

Le virus de l'EEV peut être identifié par un test de fixation du complément (FC), ou des épreuves d'inhibition de l'héماغglutination (IH), de neutralisation par la méthode de réduction des plaques (PRN pour Plaque Reduction Neutralisation), et d'immunofluorescence en employant des anticorps spécifiques de l'EEV. L'identification spécifique des variants épizootiques peut être faite avec une épreuve d'immunofluorescence indirecte ou de neutralisation par réduction des plaques en utilisant un anticorps monoclonal spécifique de sous-type ou de variant, ou par séquençage de l'acide nucléique.

Épreuves sérologiques : *la présence d'anticorps spécifiques peut être démontrée au moyen d'épreuves de neutralisation des variants épizootiques du virus de l'EEV par réduction des plaques ou du dosage immuno-enzymatique (ELISA) par capture d'IgM. Les anticorps peuvent aussi être mis en évidence par une épreuve d'inhibition de l'héماغglutination ou un test de fixation du complément.*

Tout diagnostic d'EEV chez un individu fondé sur une séroconversion en l'absence d'épizootie doit être considéré avec circonspection. Les infections des équidés par des virus enzootiques de l'EEV engendrent habituellement un faible niveau de virémie accompagné du développement d'anticorps,

mais on ne constate le plus souvent aucune expression clinique. Les anticorps induits lors de ces infections inapparentes peuvent réagir avec les variants épizootiques de l'EEV.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : les seuls vaccins acceptables contre l'EEV sont des vaccins à virus atténués préparés avec la souche TC-83, ou des préparations à virus inactivés réalisées à partir de cette même souche. Le virus atténué est immunogène lorsqu'il est administré par injection intra-musculaire, mais il cause parfois des effets secondaires chez l'animal vacciné.

Les préparations de virus virulent inactivées par le formol ne doivent jamais être utilisées chez les équidés, du virus virulent résiduel étant susceptible de persister après le traitement au formol et de causer de ce fait une maladie grave à la fois chez les animaux et les humains.

A. INTRODUCTION

L'encéphalomyélite équine vénézuélienne est une infection virale inflammatoire transmise par les arthropodes des équidés et des humains, qui se traduit par une maladie allant de bénigne à grave, avec parfois une issue fatale.

Les virus de l'encéphalomyélite équine vénézuélienne (EEV) constituent un complexe au sein du genre *Alphavirus* de la famille des *Togaviridae*. Ce complexe comprend 6 sous-types (I-VI). Le sous-type I comprend 5 variants antigéniques (AB-F) parmi lesquels les variants 1-AB et 1-C sont associés à des épizooties chez les équidés et à des épidémies concomitantes chez les humains (2-4, 8-10). Les variants épizootiques 1-AB et 1-C sont considérés comme dérivant par mutations du sérotype enzootique 1-D (11) ; les variants 1-AB et 1-C ont toujours été isolés au cours d'épizooties chez les chevaux. Les souches enzootiques comprennent les variants 1-D, 1-E et 1-F du sous-type I, le sous-type II, 4 variants antigéniques du sous-type III, et les sous-types IV et VI. En général, les virus enzootiques ne causent pas d'encéphalomyélites cliniques chez les équidés (9), mais en 1993 et 1996, le sous-type 1-E a provoqué des épizooties limitées chez des chevaux au Mexique. Les variants et sous-types enzootiques peuvent entraîner une maladie clinique chez les humains (3, 4, 5, 8, 10).

Historiquement, l'EEV épizootique était limitée aux régions du nord et de l'ouest de l'Amérique du Sud (Venezuela, Colombie, Équateur, Pérou et Trinidad) (4). De 1969 à 1972, toutefois, une épizootie (variant 1-AB) s'étendit au Guatemala, au Salvador, au Costa Rica, au Belize, au Mexique et aux États-Unis d'Amérique (USA) (Texas). Des épizooties causées par les variants 1-AB ou 1-C ne sont survenues ni en Amérique du nord ni au Mexique depuis 1972. Les isollements équins ou humains récents de virus épizootiques correspondent à des souches de sous-type 1-C isolées en 1993, 1995 et 1996 au Venezuela et en 1995 en Colombie.

Les foyers dus à des variants ou des sous-types enzootiques sont décrits dans les régions de forêt tropicale humide, c'est-à-dire les régions à haut niveau hydrostatique ou des régions marécageuses et des ruisseaux sinueux et ensoleillés. Il s'agit des régions du continent américain où les pluies sont réparties toute l'année ou de régions humides en permanence. Les virus enzootiques circulent chez les rongeurs, et peut-être les oiseaux, par l'intermédiaire des moustiques qui se nourrissent dessus (3, 4, 8, 10). Des souches de virus enzootique ont été isolées dans les Everglades en Floride (sous-type II), au Mexique (variant 1-E), dans les pays d'Amérique centrale (variant 1-E), au Panama (variants 1-D et 1-E), au Venezuela (variant 1-D), en Colombie (variant 1-D), au Pérou (variant 1-D, III-C et III-D), en Guinée française (variant III-B et sous-type V), en Équateur (variant 1-D), au Surinam (variant III-A), à Trinidad (variant III-A), au Brésil (variants 1-F et III-A et sous-type IV), et en Argentine (sous-type VI). Le variant III-B fut isolé dans une niche écologique atypique avec une association inhabituelle avec des oiseaux aux USA (Colorado et Dakota du sud) (3, 4, 8, 10).

Une suspicion d'encéphalomyélite virale chez les équidés peut être prononcée lors de l'apparition d'une maladie aiguë neurologique durant l'été dans les régions à climat tempéré ou pendant la saison des pluies dans les régions à climat tropical ou subtropical. Ce sont les saisons d'activité des insectes hématophages. L'infection virale provoquera l'atteinte clinique de nombreux équidés plutôt que des cas isolés. Lorsqu'on a affaire à des virus épizootiques, la maladie peut se propager, dans les populations sensibles, en peu de temps sur de grandes distances (3, 4, 8, 10). L'encéphalomyélite équine vénézuélienne doit être distinguée des encéphalomyélites équines de l'est ou de l'ouest (Chapitre 2.5.5.), de l'encéphalite japonaise (Chapitre 2.1.7.), de l'encéphalite due au virus West-Nile (Chapitre 2.1.20.), de la rage (Chapitre 2.1.13.) et des autres maladies avec des signes cliniques semblables dues à des agents pathogènes infectieux, parasitaires, ou autres.

Des infections ont été rapportées chez des personnes exposées à des aérosols provenant des cages d'animaux de laboratoires infectés ou d'accidents de laboratoires. Des infections graves ont été contractées par des personnels de laboratoire tant avec les variants épizootiques qu'avec les variants enzootiques (6). Des signes cliniques sévères ou la mort peuvent survenir chez l'homme. En conséquence, des virus infectieux ou leurs antigènes préparés à partir de tissus ou des cultures de cellules infectés ne doivent jamais être manipulés par

des personnels ne possédant pas une immunité validée par la présence d'anticorps neutralisants (1, 4). Toutes les manipulations de laboratoire doivent être effectuées dans des enceintes de sécurité biologique à un niveau de confinement de niveau 3 (voir le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries ») (6, 7).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

La confirmation du diagnostic d'EEV est fondée sur l'isolement et l'identification du virus ou sur la mise en évidence d'une séroconversion. La période de virémie coïncide avec le début de l'hyperthermie dans les 12 à 24 h suivant l'infection. La virémie se termine 5 à 6 jours après l'infection, ce qui coïncide avec la production des anticorps neutralisants et l'apparition des symptômes nerveux. Le plus souvent, les virus de l'EEV ne peuvent pas être isolés à partir des centres nerveux des équidés infectés. Les échantillons de sang pour isolement viral doivent être prélevés chez les animaux fébricitants présents à proximité des animaux présentant les symptômes nerveux.

Le virus peut être isolé dans le sang ou le sérum des animaux infectés par inoculation intracérébrale à des souris âgées de 1 à 4 jours ou des hamsters, ou par inoculation à d'autres animaux de laboratoire, comme les cobayes et les souris sevrés. Il peut également être isolé par inoculation à des cultures de cellules variées incluant les cellules de reins de singe vert africain (Vero), de reins de lapin (RK-13), de reins de hamster nouveau-né (BHK-21), ou les fibroblastes d'embryons de canard ou poulet, ou par inoculation à des œufs de poule embryonnés. Les détails des techniques d'identification virale sont décrits dans le Chapitre 2.5.5., « Encéphalomyélites équines (de l'est et de l'ouest) ».

Les isolats peuvent être identifiés comme correspondant au virus de l'EEV par un test de fixation du complément (FC), ou des épreuves d'inhibition de l'hémagglutination (IH), de neutralisation par réduction des plaques (PRN), et par immunofluorescence comme cela est décrit dans le Chapitre 2.5.5. Les isolats de virus de l'EEV peuvent être caractérisés par immunofluorescence indirecte ou neutralisation par réduction des plaques en utilisant un anticorps monoclonal, ou par séquençage de l'acide nucléique. La caractérisation d'un virus de l'EEV devrait être effectuée dans un Laboratoire de référence (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*).

2. Épreuves sérologiques

Le diagnostic de l'infection par le virus de l'EEV chez les équidés implique la démonstration de la présence d'anticorps spécifiques dans une paire de sérums prélevés respectivement en période aiguë et en phase de convalescence. Après infection, les anticorps neutralisants (épreuve PRN) apparaissent au bout de 5 à 7 jours, les anticorps fixant le complément au bout de 6 à 9 jours, et les anticorps inhibant l'hémagglutination au bout de 6 à 7 jours. Le second sérum prélevé en période de convalescence devrait être collecté 4 à 7 jours après le précédent, ou au moment de la mort de l'animal. Les procédures de diagnostic sérologique sont décrites en détail dans le Chapitre 2.5.5. L'historique des vaccinations doit être pris en considération dans l'interprétation des résultats des épreuves sérologiques de l'EEV. Chez les chevaux qui n'ont pas été récemment vaccinés avec une souche de virus vivant atténué, la découverte d'anticorps IgM spécifiques de l'EEV dans un seul prélèvement de sérum est suffisante pour attester une exposition récente au virus.

Tout diagnostic d'EEV chez un animal fondé sur une séroconversion en l'absence d'épizootie devrait être fait avec circonspection. En effet, bien que les sous-types et les variants enzootiques ne soient pas normalement pathogènes pour des équidés, l'infection stimulera la production d'anticorps dirigés contre les variants épizootiques.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Les vaccins acceptables contre l'infection par le virus de l'EEV sont un vaccin à virus vivant atténué préparé à partir de la souche TC-83, et un vaccin à virus inactivé préparé à partir de cette même souche (3, 4, 8, 10). Le vaccin à virus inactivé est maintenant le plus largement utilisé, et il est commercialisé sous forme de vaccins multivalents associant les valences EEE et EEV, EEE/WEE/EEV, EEE/WEE/EEV/toxine tétanique, ou encore EEE/WEE/virus de West Nile/toxine tétanique.

Le vaccin à virus inactivé devrait être administré en deux doses à intervalle de 2 à 4 semaines. Une revaccination annuelle est recommandée.

Le vaccin à virus atténué devrait être reconstitué avec un soluté salé physiologique et immédiatement utilisé. Les flacons multidoses sont placés dans la glace pendant toute la durée d'utilisation du vaccin. Un vaccin non utilisé dans les 4 h après reconstitution devrait être jeté. Les poulains de moins de 2 semaines d'âge et les juments gestantes ne devraient pas être vaccinés. Les animaux sont vaccinés par voie sous-cutanée en région cervicale avec 1 seule dose. La revaccination n'est pas recommandée.

NOTE : Les préparations contenant le virus épizootique virulent traitées par le formol ne devaient jamais être utilisées chez les équidés. Du virus virulent résiduel peut persister après le traitement au formol, et provoquer une maladie sévère. Des épizooties d'EEV sont survenues, en effet, en Amérique centrale et en Amérique du sud, après utilisation de telles préparations (8, 12).

1. Gestion des semences virales¹

a) Caractéristiques de la semence virale

La souche vaccinale atténuée TC-83 dérive d'une souche (un variant I-AB) de virus épizootique de l'EEV isolée d'un âne en 1944 à Trinidad. La souche vaccinale a été obtenue par passages en série de la souche isolée de l'âne sur des cellules de cœur de fœtus de cobaye. Inoffensive et immunogène aux niveaux de passages établis, elle induit une immunité protectrice chez les équidés vaccinés, bien que des réactions adverses puissent parfois se produire. Le vaccin avait été à l'origine développé pour protéger le personnel impliqué dans la recherche, considérée à haut risque, sur le virus de l'EEV. Les lots de semence appropriés devraient être conservés sous forme lyophilisée à -70 °C.

b) Méthodes de culture

Le virus est multiplié sur cultures de cellules de cœur de fœtus de cobaye dans un milieu approprié.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Les cellules utilisées pour la production vaccinale doivent être indemnes de toute contamination par des bactéries, des champignons, des mycoplasmes et des virus. Le virus de l'EEV est identifié dans les lots de vaccins par des épreuves PRN avec du sérum hyperimmun. Pour les vaccins inactivés produits en culture cellulaire, la souche TC-83 est traitée avec du formol.

2. Méthode de fabrication¹

Le vaccin est produit en récoltant le liquide surnageant au-dessus des cellules en monocouche de cœur de fœtus de cobaye dans lesquelles s'est effectuée la réplication du virus atténué de l'EEV. Les cultures sont maintenues à approximativement 37 °C. Le moment de la récolte est déterminé par l'apparition de l'effet cytopathogène (ECP) caractéristique, quand approximativement 70 à 100 % de la couche de cellules est affectée, ce qui se produit en général 1 à 3 jours après infection. Le liquide surnageant est clarifié par centrifugation lente et des agents stabilisateurs appropriés sont ajoutés pour protéger le virus durant la congélation et la lyophilisation.

3. Contrôles en cours de fabrication¹

Les cultures devraient être examinées quotidiennement pour suivre l'évolution de l'ECP. Après récolte, la suspension virale devrait être testée pour rechercher la présence d'éventuels contaminants microbiens.

Les vaccins à virus inactivés dérivés de la souche atténuée TC-83 devraient être contrôlés pour exclure la persistance de virus encore viable après le traitement au formol.

4. Contrôle des lots¹

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., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

¹ Les informations présentées dans les sections consacrées à la gestion des semences virales, la méthode de fabrication, les contrôles durant la fabrication, et le contrôle des lots proviennent de : the Biotechnology, Biologics, and Environmental Protection Division of the United States Department of Agriculture's Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) ».

b) Innocuité

Les tests d'innocuité des vaccins à virus inactivés sont décrits dans le Chapitre 2.5.5.

Les tests d'innocuité des vaccins à virus atténués sont réalisés sur souris. Une dose de 0,5 ml est injectée individuellement par voie intra-péritonéale à 8 souris, et les animaux sont placés en observation durant 7 jours. Si des réactions adverses attribuables au produit surviennent pendant cette période, le produit est considéré comme non satisfaisant.

c) Activité

Les tests d'activité des vaccins à virus inactivés sont identiques à ceux décrits dans le Chapitre 2.5.5., excepté que le titre en anticorps chez les cobayes inoculés sera $\geq 1/4$.

L'activité des vaccins à virus atténués peut être déterminée par des tests effectués sur chevaux. Chacun des 20 chevaux sensibles est inoculé par voie sous-cutanée avec 1 ml de vaccin lyophilisé dont le titre viral après reconstitution est au moins égal à $2,5 \log_{10}$ DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) par ml. Pour que le test soit validé, au moins 19 des 20 chevaux vaccinés doivent avoir des titres sériques en anticorps IH $\geq 1/20$ ou des titres en anticorps neutralisants $\geq 1/40$ dans un délai de 21 à 28 jours après la vaccination.

Lorsqu'il a été testé au cours de la période de validité suivant la lyophilisation, le produit doit avoir un titre viral de $0,7 \log_{10}$ plus élevé que celui utilisé pour tester les chevaux comme décrit précédemment, mais ne doit pas avoir un titre inférieur à $2,5 \log_{10}$ DICT₅₀/dose.

Le produit final doit être exempt de contaminants bactériens, fongiques, mycoplasmatiques ou viraux étrangers.

d) Durée de l'immunité

Les études interprétables sur la durée de l'immunité ne sont pas disponibles. Une revaccination annuelle est recommandée pour le vaccin à virus inactivé. Les poulains qui sont vaccinés avant l'âge de 1 an devraient être revaccinés avant la prochaine saison d'activité du vecteur. Une revaccination avec le vaccin à virus atténué n'est pas recommandée.

e) Stabilité

Le vaccin lyophilisé est stable et immunogène pendant 3 ans s'il est conservé réfrigéré entre 2 et 7 °C. Après 3 ans, le vaccin devrait être jeté. Les vaccins devraient être immédiatement utilisés après reconstitution. Les flacons multidoses de vaccins à virus atténué devraient être conservés dans la glace pendant leur utilisation. Tout vaccin inutilisé devrait être jeté au bout de 4 h après reconstitution.

f) Agents de conservation

Les agents de conservation utilisés sont le thimerosal dilué au 1/1 000 et des antibiotiques (néomycine, polymyxine, amphotéricine B, et la gentamicine).

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Les juments gestantes et les poulains de moins de 2 semaines d'âge ne devraient pas être vaccinés.

Tout personnel manipulant des virus de l'EEV infectieux ou leurs antigènes préparés à partir de tissus infectés ou de cultures de cellules devrait être vacciné et contrôlé comme ayant une immunité caractérisée par la présence d'anticorps neutralisants spécifiques. Toutes les procédures produisant des aérosols à partir des matériaux contenant du virus de l'EEV devraient être conduites dans des enceintes de sécurité biologique permettant un confinement approprié et d'un système efficace de filtration de l'air s'échappant du laboratoire (6, 7).

5. Contrôles sur le produit fini

a) Innocuité et activité

Les tests d'innocuité et d'efficacité sont identiques à ceux décrits ci-dessus pour le contrôle des lots de production (Sections C.4.b. et C.4.c.). Les vaccins à virus atténués ne doivent pas avoir un titre en virus inférieur à $2,5 \log_{10}$ DICT₅₀/dose.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BERGE T.O., BANKS I.S. & TIGERTT W.D. (1961). Attenuation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by *in vitro* cultivation in guinea pig heart cells. *Am. J. Hyg.*, **73**, 209–218.
2. CALISHER C.H., SHOPE R.E., BRANDT W., CASALS J., KARABATSOS N., MURPHY F.A., TESH R.B. & WIEBE M.E. (1980). Proposed antigenic classification of registered arboviruses. I. *Togavirus Alphavirus*. *Intervirology*, **14**, 229–232.
3. MONATH T.P. & TRENT D.W. (1981). Togaviral diseases of domestic animals. *Comp. Diagn. Vir. Dis.*, **4**, 331–440.
4. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (1972). Venezuelan encephalitis. *In: Proceedings of a Workshop/Symposium on Venezuelan Encephalitis Virus*. Sci. Publ. No. 243, Washington DC, USA, 416 pp.
5. POWERS A.M., OBERSTE M.S., BRAULT A.C., RICO-HESS R., SCHMURA S.M., SMITH J.F., KANG W, SWEENEY W.P. & WEAVER S.C. (1997). Repeated emergence of epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis from a single genotype of enzootic subtype ID virus. *J. Virol.*, **71**, 6697–6705.
6. SUBCOMMITTEE ON ARBOVIRUS LABORATORY SAFETY OF THE AMERICAN COMMITTEE ON ARTHROPOD-BORNE VIRUSES (1980). Laboratory safety for arboviruses and certain viruses of vertebrates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**, 1359–1381.
7. UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (1999). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. US Government Printing Office, Washington DC, USA, 190–196.
8. WALTON T.E. (1981). Chapter 24. Equine encephalomyelitis. *In: Virus Diseases of Food Animals. A World Geography of Epidemiology and Control*. Disease Monographs, Vol. 2, Gibbs E.P.J., ed. Academic Press, New York, USA, 587–625.
9. WALTON T.E., ALVAREZ O. Jr, BUCKWALTER R.M. & JOHNSON K.M. (1973). Experimental infection of horses with enzootic and epizootic strains of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J. Infect. Dis.*, **128**, 271–282.
10. WALTON T.E. & GRAYSON M.A. (1989). Chapter 46. Venezuelan equine encephalomyelitis. *In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. 4, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 203–231.
11. WEAVER S.C., FERRO C., BARRERA R. BOSCHELL J. & NAVARRO J.C. (2004) Venezuelan equine encephalitis. *Annu. Rev. Entomol.*, **49**, 141–174.
12. WEAVER S.C., PFEFFER M., MARRIOTT K., KANG W. & KINNEY R.M. (1999) Genetic evidence for the origins of Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB outbreaks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**, 441–448.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour l'Encéphalomyélite équine vénézuélienne (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 2.6.

LAGOMORPHA

CHAPITRE 2.6.1.

MYXOMATOSE

RÉSUMÉ

La myxomatose est une maladie majeure du lapin européen due au virus myxomateux (VM), un membre de la famille des Poxviridae. Le diagnostic de la myxomatose, ses caractéristiques cliniques mises à part, fait appel à l'isolement et à l'identification du virus ou à la mise en évidence de ses antigènes. La présence d'une réponse immunitaire humorale autorise un diagnostic rétrospectif de la forme subaiguë de la maladie, et peut permettre une estimation de la prévalence de l'infection dans une population de lapin. La maladie est caractérisée classiquement par le développement de lésions cutanées nodulaires des plus évocatrices.

Identification de l'agent pathogène : *lors de la présence de lésions cutanées sur un cadavre de lapin, la présence de l'antigène viral peut être révélée par un test d'immunodiffusion utilisant un fragment de lésion. Des cultures en couche monocellulaire de cellules de rein de lapin, inoculées à partir de lésions, développent un effet cytopathogène caractéristique des poxvirus. La présence du virus peut alors être confirmée par immunofluorescence et examen au microscope électronique en coloration négative.*

L'identification de l'infection, par inoculation de lapins avec des prélèvements suspects, est plus longue mais demeure précieuse pour confirmer la présence d'un virus infectieux et évaluer sa pathogénicité.

Épreuves sérologiques : *la mise en évidence et le titrage des anticorps spécifiques apparaissant au cours de l'infection naturelle ou à la suite de la vaccination, est réalisée par la méthode classique de fixation du complément ou par la méthode immuno-enzymatique (ELISA) récemment développée, plus sensible et non affectée par les facteurs pro- ou anti-complémentaires. La difficulté réside dans l'obtention de prélèvements de sang à partir de membres représentatifs d'une population. Ce problème peut être résolu en récoltant sur du papier filtre du sang séché qui sera plus tard élué et examiné en immunofluorescence indirecte ou en ELISA. Des prélèvements en tubes microcapillaires peuvent aussi être utilisés en ELISA.*

Des tests d'immunodiffusion qualitative en gélose permettent de révéler à la fois les antigènes et les anticorps humoraux.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *des vaccins à virus vivants préparés à partir du virus du fibrome de Shope ou du virus myxomateux modifié sont disponibles pour l'immunisation des lapins.*

A. INTRODUCTION

La myxomatose est une maladie majeure du lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) due au virus myxomateux (VM), un membre de la famille des *Poxviridae*. Ce virus a été isolé pour la première fois en Uruguay en 1898 à partir de lapins de laboratoire et a été caractérisé comme un poxvirus en 1927. Dans les conditions naturelles, il affecte deux espèces de léporidés : *Sylvilagus brasiliensis* en Amérique du Sud (souches sud-américaines) et *Sylvilagus bachmani* en Californie (souches californiennes) (7). Chez leur hôte naturel, les souches virales

n'induisent qu'un fibrome bénin, la maladie généralisée ne se produisant seulement que chez les jeunes. Chez le lapin européen, deux formes de la maladie ont été décrites : la forme nodulaire (ou classique) et la forme non-myxomateuse (respiratoire).

La forme nodulaire due à une souche virulente du VM est caractérisée par des lésions cutanées exubérantes et une immunodépression, souvent associées à des surinfections de l'appareil respiratoire par des bactéries contaminantes Gram négatives. Des souches prototypes isolées de foyers australiens ou européens caractérisent les différents degrés de virulence (du niveau I au niveau V) tels qu'ils sont établis sur des lapins de laboratoire (8). Après infection par une souche de niveau I (la plus virulente), le premier symptôme est une boiterie du côté du point d'inoculation qui devient protubérant et s'ulcère. Une blépharo-conjonctivite aiguë et un œdème du périnée et du scrotum se développent graduellement. Les lésions cutanées secondaires apparaissent entre environ 6 et 7 jour (7). La mort peut éventuellement survenir entre le 8^e et le 15^e jour après l'infection. Lors d'une infection avec des souches des niveaux II à V, les symptômes sont en général identiques excepté que l'évolution est plus lente et moins grave. Quand les animaux survivent, les lésions guérissent progressivement. Le taux de mortalité varie de 20 % à 100 % selon la souche virale. La transmission habituelle de la forme nodulaire se fait par des insectes piqueurs, mais une transmission de lapin à lapin est possible lorsqu'ils sont enfermés, mais elle est limitée. Cette forme est plus fréquemment observée dans les petits élevages (2). Les symptômes de la forme non myxomateuse sont essentiellement respiratoires, les nodules cutanés étant petits et peu nombreux. On pourrait penser que cette forme n'est pas transmise par des vecteurs et qu'elle survient plutôt dans les grands élevages intensifs, mais il convient d'être prudent avant d'avancer cette hypothèse, car la forme non myxomateuse a aussi été observée chez des lapins sauvages. Jusqu'à présent, ces formes de myxomatose n'ont été signalées qu'en France (5, 15), en Espagne (18) et plus récemment en Belgique (16).

Le spectre d'hôtes du VM est très étroit et ne présente aucun risque pour les humains.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Dans la mesure où les signes de la maladie deviennent plus discrets avec l'atténuation des souches de virus, l'envoi de prélèvements au laboratoire devient de plus en plus nécessaire. Cependant, le tropisme cutané est réduit dans le cas des souches non myxomateuses du VM, et l'expression clinique de la forme non myxomateuse rend le diagnostic clinique plus difficile que dans le cas de la forme classique. Les différentes techniques disponibles varient dans leur capacité à détecter le VM dans les lésions myxomateuses typiques, dans l'œdème des paupières ou des organes génitaux. Néanmoins, le diagnostic des formes atténuées ou des formes atypiques (non myxomateuses) doit être confirmé par isolement du virus sur des lignées de cellules sensibles telles que la lignée RK-13 (ATCC CCL37) et par identification du virus par les méthodes immunologiques. Dans tous les cas, l'agent causal peut aussi être identifié par la mise en évidence de l'acide nucléique du VM par amplification en chaîne par polymérase (PCR) ; les techniques moléculaires n'ont pas été évaluées quant à leur utilité diagnostique.

1. Identification de l'agent pathogène

Une portion de lésion (myxome, organes ou tissus, notamment les paupières) est excisée à l'aide de ciseaux. Le myxome est débarrassée de l'épiderme et de la couche superficielle du derme. Elle est lavée en solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) additionné d'antibiotiques comme défini ci-dessous, puis broyée et homogénéisée à une dilution de 1 g de tissu pour 4,5 à 9,0 ml de PBS. Les cellules sont rompues par deux cycles de congélation-décongélation, ou par ultrasonication, afin de libérer les virions et les antigènes. Cette suspension est centrifugée pendant 5 à 10 min à 1 500 *g*. Le surnageant est utilisé pour les épreuves.

a) Culture

L'isolement du virus en culture de cellules peut utiliser des cultures de cellules de première explantation de rein de lapin (RK), ou des cellules établies en lignée continue, telle que la lignée RK-13, en milieu Opti-MEM (MEM pour milieu essentiel minimal) contenant 2 % de sérum de veau ; 300 Unités Internationales (UI)/ml de pénicilline ; 300 µg/ml de streptomycine ; 100 µg/ml de gentamycine ; 50 UI/ml de nystatine (mycostatine) ; et 5 µg/ml d'amphotéricine (fungizone). L'inoculum est représenté par le surnageant de l'homogénat de lésion ou par du jetage oculo-respiratoire repris en Opti-MEM additionné de 2 % de sérum de veau et d'antibiotiques. L'inoculum est retiré de la couche de cellules au bout de 2 h. Les cellules sont rincées avec un faible volume de milieu puis recouvertes de milieu d'entretien (Opti-MEM).

Un effet cytopathogène (ECP) typique des poxvirus (14) se développe en 24 à 48 h (à 37 °C et 5 % de CO₂), mais avec certaines souches, il peut être plus lent et n'apparaître qu'au bout de 7 jours. Selon la souche de virus, des groupes de cellules voient leur cytoplasme confluer et forment des syncytia de taille variable, renfermant de 2 à 50 noyaux et même rassemblant jusqu'à une centaine de noyaux. Le noyau de certaines cellules présente des altérations, la chromatine formant des agrégats basophiles de taille et en

nombre variables, donnant à la culture un aspect en peau de léopard. Les inclusions intracytoplasmiques éosinophiles, lorsqu'elles sont présentes, demeurent discrètes. Les cellules infectées s'arrondissent, se contractent, deviennent pycnotiques puis se lysent et se détachent de leur support (verre ou plastique). A la longue, toutes les cellules seront infectées et la couche monocellulaire se détache complètement.

Le virus du fibrome de Shope produit tout d'abord des foyers d'accumulation de cellules arrondies qui prolifèrent et s'empilent (14). À la périphérie, les cellules récemment infectées montrent de légères modifications nucléaires et des inclusions cytoplasmiques acidophiles nombreuses et précoces. La couche cellulaire est détruite en plusieurs jours.

b) Méthodes immunologiques

Les tests d'immunodiffusion en gélose (IDG) sont de réalisation facile et rapide – les résultats peuvent être obtenus en 24 h. Les plaques de gélose sont préparées avec de l'agar Noble (0,6 g), de l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (2,5 g), du chlorure de sodium (4,5 g), et de l'eau distillée (500 ml) contenant du thiomersal (merthiolate) à 1/100 000. L'antisérum de référence (voir ci-dessous) et l'échantillon à tester sont placés dans des puits opposés de 6 mm de diamètre, séparés de 5 mm. Une autre technique consiste à déposer un fragment de lésion directement sur la gélose, à 5 mm d'un disque de papier filtre imprégné de l'antisérum. Des lignes de précipitation, habituellement jusqu'à 3, apparaissent en 48 h, indiquant la présence d'antigènes du VM. Une ligne unique apparaît lors de réaction hétérologue avec le virus du fibrome de Shope.

Les épreuves d'immunofluorescence indirecte (IFI) peuvent être appliquées sur les cultures à partir de 24 h d'incubation. Les épreuves d'IFI révèlent la multiplication intracytoplasmique du virus mais ne peuvent distinguer le VM de celui du fibrome de Shope. L'inoculation de cellules d'embryon de poulet (trypsinisées à 11 jours d'incubation) n'entraîne pas d'ECP mais est propice à la détection des antigènes viraux par immunofluorescence.

c) Microscopie électronique

La microscopie électronique en coloration négative peut être appliquée à un fragment de lésion cutanée. La technique est simple et rapide, donnant des résultats en 1 h. Environ 1 mm³ de tissu est disposé sur un verre de montre et 3 gouttes d'eau distillée sont ajoutées. Après 1 à 2 min à la température ambiante une grille de microscopie électronique revêtue de formvar et de carbone est posée sur le liquide. Après 1 min, l'excès de liquide est éliminé délicatement à l'aide d'un papier filtre et, immédiatement une goutte d'une solution aqueuse à 2 % de molybdate d'ammonium, pH 7,0 ; est déposée sur la grille. Au bout de 10 s, l'excès de liquide est absorbé à l'aide d'un papier filtre et la grille est prête pour l'examen au microscope électronique. Lors d'examen positif, des particules typiques de poxvirus peuvent être vues mais cette méthode ne permet pas de différencier le VM de celui du fibrome de Shope.

d) Tests d'inoculation

L'inoculation d'un lapin par voie intradermique permet aussi d'identifier le virus grâce à ses caractéristiques pathogènes (niveaux de virulence, formes classique ou non-myxomateuse), à savoir son tropisme cutané (forme nodulaire) et oculo-respiratoire (forme non myxomateuse). Elle doit être évitée si possible, mais présente l'avantage de permettre d'apprécier la virulence en fonction du type d'inflammation des lésions (local ou généralisé), de l'étendue des lésions et du temps de survie, ainsi que de distinguer le virus du fibrome de Shope (avec une simple lésion fibromateuse locale) du virus myxomateux (capable d'entraîner une infection généralisée chez l'adulte). On choisira des lapins domestiques pesant environ 2 kg, non vaccinés et chez lesquels on vérifiera préalablement l'absence d'anticorps (14).

L'inoculum peut être le surnageant d'une lésion homogénéisée (avec antibiotiques) ou le produit d'une culture. Un volume de 0,1 à 0,2 ml est injecté par voie intradermique à la face postérieure de l'oreille ou dans la région dorso-lombaire préalablement débarrassée de ses poils. L'inoculum peut faire l'objet d'injections de dilutions sériées en tampon salin à raison de un site par dilution. Une lésion primaire apparaîtra au point d'injection en 2 à 5 jours, suivie d'une conjonctivite. En utilisant 5 sites par dilution il est possible de calculer une dose infectieuse 50 % (DI₅₀). Si l'animal survit, la maladie peut être confirmée par la sérologie 15 jours plus tard.

2. Épreuves sérologiques

Les anticorps apparaissent en 8 à 13 jours. Lors de formes non létales ou après vaccination, le titre atteint un sommet entre 20 à 60 jours ; il décline ensuite et les anticorps deviennent indétectables au bout de 6 à 8 mois en l'absence de ré-infection (données correspondant à la fixation du complément [FC]) (19).

Diverses épreuves sérologiques peuvent être utilisées, mais l'immunodiffusion en gélose (IDG), la FC, l'IFI et la méthode immuno-enzymatique (ELISA), (dans l'ordre de sensibilité croissante), sont les épreuves les plus appropriées pour les échanges internationaux et les autres applications. Ces épreuves réclament des antigènes et antisérums de référence. L'antigène peut être préparé à partir de la souche Lausanne ou d'une souche antigéniquement rattachée, produites sur lapins ou culture de cellules.

- **Préparation des réactifs de référence (IDG, FC et IFI)**

- **Préparation de l'antigène**

Des lésions myxomateuses sont prélevées sur lapins, 6 à 7 jours après inoculation, puis homogénéisées en tampon véronal à la dilution de 1/5. L'antigène est le surnageant obtenu après centrifugation (1 500 **g** pendant 5 à 10 min). Une activité anti-complémentaire éventuelle est supprimée par addition de 0,6 % de chloroforme. Le liquide antigénique peut être stocké à –30 °C ou –70 °C ou utilisé directement en FC après titrage à l'aide d'un antisérum de référence.

L'antigène peut être préparé à partir de culture sur cellules de lignée RK-13. Les cellules RK-13 (cellules de rein de lapin CCL-37) sont cultivées 48 h avant inoculation dans du milieu de Eagle modifié Dulbecco (DMEM, Gibco) contenant 10 % de sérum de veau fœtal, de la pénicilline et de la streptomycine. Les cellules sont incubées à 37 °C avec une atmosphère à 5 % de CO₂. Les cellules sont infectées avec la souche de VM à un taux d'infection de 1-5. Après une incubation de 2 h à 37 °C, l'inoculum est retiré et les cellules sont cultivées pendant 48 h dans du milieu DMEM avec 5 % de sérum de veau fœtal (incubation : 37 °C, 5 % de CO₂). Le tapis cellulaire est récolté 48 h après infection, quand l'ECP est clairement visible (80 %), puis centrifugé (1 000 **g**). Le liquide surnageant est recueilli. Le culot cellulaire est congelé-décongelé 3 fois pour récupérer tout le virus et la suspension virale est clarifiée à 1 000 **g**. Le surnageant est ajouté au précédent. L'ensemble des surnageants constitue l'antigène qui est stocké à –20 °C ou –70 °C pour être conservé. Il est titré en cultures cellulaires avant son utilisation.

- **Titrage de l'antigène de référence par la fixation du complément**

- i) Inactiver un antisérum de référence pendant 30 min au bain-marie à 56 °C. Il n'existe pas de sérum de référence international, mais des sérums de référence interne au laboratoire doivent être préparés et titrés selon une échelle appropriée, en utilisant la FC ou l'ELISA. Après cela, la méthode suivante est utilisée pour normaliser les lots d'antigène.
- ii) Faire des dilutions en série, de raison deux, du sérum de référence en tampon calcium/magnésium/véronal (CMV) (BIOMERIEUX, réf. 72171), pH 7,2, de 1/2 à 1/4096, dans une plaque de micro-titrage à 96 puits à fond rond, une dilution par range (colonne) et 25 µl par puits.
- iii) Utilisant des tubes, faire des dilutions de raison deux de l'antigène en tampon CMV de 1/10 à 1/1280.
- iv) Ajouter 25 µl par puits de la même dilution du premier antigène à chaque puits de la première ligne de la plaque ; de manière similaire, ajouter les dilutions suivantes de l'antigène dans les puits des lignes suivantes afin d'obtenir un titrage en échiquier de l'antigène et de l'anticorps.
- v) Ajouter 25 µl (6 unités H50 [50 % d'hémolyse]) de complément par puits.
- vi) Incuber la plaque couverte d'un film de plastique, pendant 1 h à 37 °C ou 14 h à 4 °C.
- vii) Ajouter 50 µl par puits du système hémolytique (2,5 % de globules rouges [GR] de mouton et un volume égal de sérum anti-GR de mouton, les deux dilués dans du CMV (pour avoir la dilution de travail optimale, suivre les recommandations du fabricant, sinon déterminer individuellement cette dilution pour chaque lot de sérum utilisé).
- viii) Couvrir de nouveau la plaque et incuber pendant 30 min à 37 °C.
- ix) Lire la plus haute dilution de l'antigène donnant une hémolyse complète (H₁₀₀) avec la plus haute dilution du sérum de référence. Il y a 1 unité antigénique (AgU) dans 25 µl de cette dilution de l'antigène.

- **Titrage des particules infectieuses du virus *Myxoma* en cultures cellulaires**

- i) Diluer le virus de 10⁻¹ à 10⁻⁵ dans du DMEM avec antibiotiques et 2 % de sérum de veau fœtal.
- ii) Infecter un tapis confluent de cellules RK-13 (P6 – plaques Falcon) trois exemplaires avec 200 µl des dilutions en série intéressantes et incuber à 37 °C pendant 2 h dans une atmosphère à 5 % de CO₂.
- iii) Retirer l'inoculum et ajouter dans chaque puits 2 ml de DMEM avec 5 % de sérum de veau fœtal.
- iv) Incuber à 37 °C en atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 2 jours.
- v) Retirer le milieu liquide et le remplacer par un milieu solide avec 1 % d'agarose LMP et 2 % de sérum de veau fœtal.

- vi) Incuber à nouveau 1 à 2 jours ; les plages sont alors comptées sans coloration pour chaque dilution (une coloration est possible en ajoutant du rouge neutre dans le milieu solide).
- vii) Le titre est donné en unités formant plages (UFP) par ml.

- **Préparation et titrage du sérum positif de référence**

Pour l'anti-sérum de référence, un lapin adulte, à sérologie négative, est vacciné avec une souche atténuée de VM ou avec le virus du fibrome de Shope. Après 3 à 4 semaines, ce lapin est inoculé par voie intradermique avec une souche virulente de VM (souche Lausanne ou apparentée) (5×10^3 UFP). Le sérum, obtenu 3 semaines plus tard, est titré en FC ou en ELISA. Si le titre atteint ou dépasse 1/640 ou 1/1000 respectivement pour la FC et l'ELISA, l'animal est saigné et son sérum stocké à -20°C .

- a) **Test de fixation du complément**

Les tests de FC (19) sont effectués en tubes ou en plaque de micro-titrage (6) par les méthodes conventionnelles, en retenant 100 % ou 50 % d'hémolyse. C'est, à l'heure actuelle, la méthode de référence.

- i) Titrer le complément en tubes à hémolyse, en présence de 1 AgU, afin de déterminer l'unité H_{50} .
- ii) Inactiver le sérum à tester et les sérums témoins positif et négatif au bain-marie pendant 30 min à 56°C .
- iii) Faire des dilutions de raison deux, du sérum à tester et des sérums témoins, en CMV, de 1/4 à 1/1024, en utilisant une plaque micro-titrage à 96 puits à fond rond, à raison de 25 μl par puits. Utiliser le premier puits pour la dilution 1/4 initiale et le second comme témoin sérum (contrôle du pouvoir anti-complémentaire à la dilution du 1/4). Préparer les puits contrôles de l'antigène (sans sérum), du complément et des GRs (voir ci-dessous) (2 puits pour chacun).
- iv) Ajouter 1 AgU d'antigène du VM dans 25 μl par puits (à l'exception des puits témoins du sérum, du complément et des GRs), puis, ajouter 6 H_{50} de complément dans 25 μl par puits (à l'exception du témoin GRs).
- v) Incuber les plaques recouvertes d'un film plastique, pendant 14 h (durant la nuit) à 4°C .
- vi) Ajouter 50 μl de système hémolytique par puits.
- vii) Couvrir à nouveau les plaques et incuber pendant 30 min à 37°C .
- viii) Préparer une échelle de témoins d'hémolyse H_{100} , H_{75} , H_{50} , H_{25} à partir des témoins complément (H_{100}) en tampon CMV.
- ix) Lire, après centrifugation (1 000 **g** pendant 10 min) ou sédimentation passive à 4°C . Le titre des sérums testés est exprimé par la plus haute dilution du sérum donnant au moins 50 % d'inhibition de l'hémolyse.
- x) Un sérum négatif doit donner une inhibition de l'hémolyse $< 50\%$, à la dilution du 1/4.

- b) **Épreuve d'immunofluorescence indirecte**

L'épreuve d'IFI (11) est réalisée sur culture de cellules d'embryon de poulet ou de cellules RK-13 obtenue en plaque de microtitrage à puits à fond plat : la suspension cellulaire (4×10^4 cellules dans du milieu), est distribuée dans tous les puits et une couche confluyente de cellules est produite en 24 h. Le milieu est alors éliminé et 100 μl de suspension virale (taux de multiplicité de 0,05) sont ajoutés dans chaque puits. Après 2 h d'incubation, 100 μl de MEM contenant 2 % de sérum de veau est ajouté. Après 48 h d'incubation, les plaques sont lavées avec du PBS et fixées à l'acétone contenant 50 % d'éthanol, pendant 30 min à -20°C ou au paraformaldéhyde (4 % dans du PBS) à température ambiante. Les plaques sont ensuite séchées à 37°C pendant 15 min. Les plaques peuvent dès lors être stockées à -30°C ou -70°C pendant 3 mois. Les sérums sont soumis à l'épreuve d'IFI utilisant des IgG anti-lapin conjugués à de l'isothiocyanate de fluorescéine. Les résultats peuvent être exprimés de façon qualitative avec des sérums dilués au 1/20, ou de façon quantitative en utilisant des dilutions sériées des sérums.

- c) **Épreuve immuno-enzymatique (ELISA)**

Un test ELISA récemment développé (10) utilise un virus myxomateux semi-purifié (souche française T1 hyper virulente, antigéniquement rattachée à la souche Lausanne) produite en cellules RK-13. Le virus est récolté sous la forme d'une suspension de cellules 48 h après infection, puis centrifugé. Le culot

cellulaire est homogénéisé en TL20 (20 mM Tris, pH 8,6, 150 mM de NaCl et EDTA 1 mM), rompues au broyeur de Potter et centrifugé à 1 200 **g** à 4 °C, pendant 10 min.

Le surnageant est déposé sur un volume égal d'un coussin de sucrose à 36 % en TL20 et centrifugé à 200 000 **g** pendant 2 h dans un rotor SW 41 à 4 °C. Le culot est repris dans 4 à 12 ml de TL20 et de nouveau déposé sur un coussin de sucrose à 36 %.

Le nouveau culot est repris dans 0,5 à 1 ml de TL20 et quantifié par la méthode de Bradford (réaction colorimétrique avec le bleu brillant de Comassie) (3) ou par spectrophotométrie (les protéines virales représentent environ 3/5 des protéines totales). La préparation peut être stockée à –30 °C avant utilisation.

- i) Sensibiliser les plaques ELISA (Falcon) pendant 16 h (une nuit à 37 °C) avec 1 µg par puits, de protéines virales dans 100 µl de PBS, pH 7,6, en laissant une colonne comme blanc (c'est à dire traitée avec le seul PBS). À noter que les différents lots d'antigène présentent une activité variable et doivent être titrés contre des sérums de référence afin de sélectionner l'antigène donnant la plus haute densité optique (DO).
- ii) Après 3 lavages en PBS, bloquer les sites de liaison encore libres par une incubation pendant 1 h à 37 °C en présence de gélatine en PBS (25 mg/ml).
- iii) Laver la plaque 3 fois en PBS (0,01 % Tween 20), et ajouter 100 µl de dilutions sériées, de raison deux, du sérum en PBS-Tween. Ajouter des sérums témoins négatif et positif dans chaque plaque.
- iv) Après 60 min d'incubation à 37 °C et 3 lavages en PBS-Tween, ajouter 100 µl d'une dilution en PBS-Tween d'un sérum de chèvre anti-IgG de lapin (préalablement titré) conjugué à de la phosphatase alcaline, pendant 1 h à 37 °C.
- v) Après 4 lavages en PBS-Tween (ou plus si le lavage est effectué avec seulement du PBS), ajouter en tant que substrat, 100 µl de p-nitrophényl phosphate disodique à la concentration de 1 mg/ml dans 10 % de diéthanolamine.
- vi) Après 12 min à l'obscurité, à température ambiante, la réaction enzymatique est arrêtée par adjonction de 50 µl d'une solution 2 N de NaOH.
- vii) Lire les Densités Optiques (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre, à 405 nm de longueur d'onde.
- viii) Exprimer le titre du sérum testé par l'inverse de la plus haute dilution pour laquelle la DO est 3 fois supérieure à celle enregistrée avec le sérum témoin négatif à la même dilution.

La mise en évidence des anticorps spécifiques du virus myxomateux par ELISA s'est révélée une méthode hautement sensible et spécifique pour les études cinétiques lors d'infection expérimentale (3). L'évaluation du test a montré sa grande valeur dans le cadre du diagnostic au sein de populations de lapins (10).

Pour les enquêtes épidémiologiques, l'IFI et l'ELISA indirecte peuvent aussi être réalisées en utilisant du sang séché sur papier buvard ou papier filtre. Des disques sont découpés à l'aide d'un emporte pièce de bureau et deux disques sont placés dans chaque puits auquel on ajoute 100 µl de PBS pour extraire le sérum. La dilution du produit extrait est d'environ 1/20 et celle-ci peut être utilisée dans un autre puits pour le test (11). Des prélèvements de sang récoltés en tubes capillaires revêtus d'anticoagulant peuvent être utilisés pour l'ELISA. Le prélèvement est rincé dans la solution de dilution pour obtenir la dilution requise (17).

d) Test d'immunodiffusion en gélose

Le test d'immunodiffusion en gélose (IDG) (22) est qualitatif et peut révéler l'antigène ou l'anticorps. La gélose est préparée comme décrit ci-dessus (Section B.1) et 6 ml sont versés dans une boîte de Petri de 10 cm de diamètre. Deux bandes de papier filtre contenant, l'une l'antigène et l'autre le sérum de référence, et des disques imprégnés à l'aide des sérums à tester, sont disposés sur la surface de la gélose (les disques alignés entre les deux bandes). Les plaques de gélose sont incubées en atmosphère humide à 37 °C et lues après 24 à 48 h. Trois lignes de précipitation doivent apparaître. Si les sérums testés contiennent l'anticorps spécifique du VM, au moins une des trois lignes est infléchie vers la bande contenant l'antigène ; sinon elle reste droite. Si les sérums renferment de l'antigène du VM, au moins une ligne est infléchie vers la bande contenant le sérum de référence. Le test peut aussi être réalisé de façon plus conventionnelle en plaçant les réactifs liquides dans des puits creusés dans la gélose.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Deux types de vaccin à virus vivant sont utilisés contre la myxomatose : un vaccin hétérologue préparé avec le virus du fibrome de Shope (9, 13, 21), et un vaccin homologue préparé avec une souche atténuée de virus myxomateux (1, 12, 20, 23, 25). Ils sont injectés par voie sous-cutanée ou intradermique.

Récemment, un nouveau virus myxomateux recombinant exprimant une protéine de capsid du virus de la maladie hémorragique du lapin (RHDV, *Rabbit Haemorrhagic Disease Virus*) et conférant une double protection contre la myxomatose et le RHDV (3) a été développé, mais il n'est pas encore commercialisé.

Les lignes directrices pour la fabrication de vaccins vétérinaires sont exposées 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 et peuvent être complétées par des exigences nationales et régionales.

Un lot de semence primaire du virus doit être défini et utilisé selon le système lot-semence. Son origine, l'historique des passages qu'elle a subi et ses caractéristiques doivent être enregistrés et conservés.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Les virus utilisés sont le virus du fibrome de Shope ou le virus myxomateux. Les souches du virus du fibrome de Shope sont habituellement la souche originale Shope OA (1932), la souche Boerlage ou des souches étroitement apparentées. Les souches de virus myxomateux sont modifiées par passages sur œufs embryonnés de poulet, cellules de rein de lapin à température décroissante ou sur cellules d'embryon de poulet. Les souches ont, en général, subi plusieurs clonages.

b) Méthode de culture

Les souches de virus du fibrome de Shope sont maintenues par passage sur lapins exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) ou sur des lapins non vaccinés issus d'un élevage reconnu sans myxomatose. La peau du dos de lapins adultes en bonne santé est rasée, puis on inocule en différents points une suspension à 1 % de matériel virulent. Les fibromes sont pleinement développés en 8 à 10 jours. Les lapins sont alors sacrifiés et les tumeurs prélevées aseptiquement puis homogénéisées en eau distillée. La suspension est stockée à –30 °C ou –70 °C avec 50 % de glycérine tamponnée ou diluée à 5 % en solution protéinée (albumine bovine). La production du virus du fibrome de Shope peut être aussi réalisée en lignée cellulaire de derme de lapin.

Le virus myxomateux est produit sur culture de cellules d'embryon de poulet obtenu d'élevages reconnus exempts d'organismes pathogènes spécifiques, ou sur lignées de cellules sensibles (lignée de cellules dermiques de lapin). Le virus peut aussi être cultivé sur cellules RK-13.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

i) Identité

Les caractéristiques antigéniques spécifiques du virus du fibrome de Shope sont vérifiées en AGID utilisant des sérums anti-fibrome et anti-myxome.

L'identité du virus myxomateux est confirmée par un test de neutralisation sur cellules RK-13 ou tout autre lignée cellulaire sensible en utilisant un anti-sérum monospécifique (produit par vaccination de lapins avec la souche spécifique du virus vaccinal).

ii) Pureté

Le lot de semence primaire doit être exempt de bactéries, de champignons, de mycoplasmes et de contamination virale.

iii) Innocuité

Les échantillons destinés aux essais d'innocuité doivent provenir d'un lot produit selon le protocole de fabrication. La dose à utiliser contiendra le titre ou l'activité maximum établi(e) par le fabricant (titre disponible).

Plusieurs tests sont effectués, au stade du lot de semence primaire, afin de démontrer différents aspects de l'innocuité. L'innocuité à 10 fois la dose normale doit être révélée. De même, il est nécessaire de rechercher la dissémination du virus parmi les animaux vaccinés, la capacité du virus vaccinal de diffuser de l'animal vacciné vers des animaux contacts et de mettre en évidence une réversion possible de la virulence de la souche vaccinale lors de passages en série chez le lapin.

La pathogénicité du virus du fibrome de Shope est évaluée par inoculation de lapins avec des dilutions sériées des surnageants issus de la centrifugation de préparations tumorales. Les aspects macroscopiques et histopathologiques ainsi que l'évolution des fibromes sont notés périodiquement sur des lapins EOPS. (De nombreux passages en série sur le lapin peuvent induire une mutation vers la souche inflammatoire IA, qui produit des lésions sévères beaucoup plus inflammatoires que néoplasiques).

Le pouvoir pathogène résiduel du virus myxomateux est évalué par inoculations intradermiques chez des lapins EOPS ou des sujets non vaccinés indemnes de myxomatose. Ces lapins ne doivent pas développer plus qu'une réaction locale, accompagnée parfois de petites lésions secondaires sur la tête mais qui disparaissent en quelques jours.

Pour ces deux souches, la température rectale et le poids doivent être enregistrés en tant que paramètres supplémentaires.

iv) *Efficacité*

Différents essais doivent être conduits à partir de lots représentatifs du produit fini contenant le titre ou l'activité minimum. L'effet protecteur est démontré de la façon suivante :

Au moins 10 lapins adultes reçoivent une dose de vaccin « fibrome », et 3 lapins servent de témoins non vaccinés. Après 14 jours, tous les lapins sont inoculés par voie intradermique dans la paupière, avec une souche de virus myxomateux (exemple : inoculum de 0,1 ml contenant 10^3 DI₅₀ [dose infectieuse médiane]). Durant les 21 jours suivants, les témoins succombent à la myxomatose, et au moins sept des dix sujets vaccinés doivent ne présenter aucun signe de généralisation de l'infection.

De la même façon, le vaccin « myxome » est évalué chez 10 lapins et 3 sujets contrôles. Après 14 jours, tous les lapins sont éprouvés avec une quantité suffisante d'une souche virulente (exemple : 0,1 ml de la souche Lausanne renfermant 10^3 DI₅₀). Après 21 jours, sept des dix lapins vaccinés doivent survivre tandis que les témoins doivent avoir succombé à la myxomatose.

Le fabricant aura établi un titre ou une activité minimum tenant compte de la perte d'activité durant la période de conservation.

2. Méthode de fabrication

Le virus du fibrome de Shope est produit suite à des inoculations multiples du virus semence dans la peau du dos d'un certain nombre de lapins. Après homogénéisation du fibrome, le produit peut être conservé congelé ou être utilisé immédiatement. La production peut aussi être réalisée en lignée cellulaire de derme de lapin. Seul le second (éventuellement le troisième) passage peut être utilisé si l'on veut éviter une modification du virus. Après clarification par centrifugation, le surnageant est mélangé à un stabilisant contenant des antibiotiques et réparti en ampoules ou flacons pour être lyophilisé. Du kaolin peut être ajouté en tant qu'adjuvant (40 mg/ml), dans ce cas le vaccin sera injecté par voie sous-cutanée.

Le virus myxomateux est produit en cellules d'embryon de poulet (obtenu d'œufs EOPS) ou en lignée cellulaire sensible, en limitant le nombre de passages à un maximum de 5. Le virus est récolté après 2 à 6 jours. La suspension virale peut être conservée à -70°C . Le vaccin est préparé par dilution en proportions spécifiées de la préparation virale avec un stabilisant pour lyophilisation. Après homogénéisation, le produit est distribué en flacon de lyophilisation, ces derniers étant scellés sous vide ou en atmosphère d'azote stérile.

Chacun de ces virus peut être aussi produit en cellules RK-13.

3. Contrôles en cours de fabrication

Le titre de virus du fibrome de Shope est obtenu en calculant la DI₅₀ suite à l'inoculation intradermique de dilutions sériées du surnageant clarifié, en plusieurs sites (par exemple 5) sur au moins 6 lapins. Une dilution d'une préparation de référence de virus du fibrome de Shope est aussi inoculée sur chaque lapin pour s'assurer d'une réponse conforme à l'inoculation. Le titre peut aussi être calculé en lignée cellulaire de lapin. Dans l'un et l'autre cas, le titre doit être corrélé à l'activité requise par le test d'efficacité, voir Section C.1.c.

L'identité du virus myxomateux est vérifiée en cellules RK. Le titrage de chaque virus peut aussi être réalisé en cellules RK-13 DICT₅₀.

La recherche de contaminants viraux est effectuée par ensemencement de cellules Vero en couche monocellulaire confluyente. Le vaccin, ajusté à l'équivalent de 20 doses/ml, est neutralisé avec un volume égal de sérum hyperimmun monospécifique pendant 30 min à 37 °C. Le mélange est filtré à travers une membrane de 0,22 µm et des volumes de 1 ml sont inoculés dans 5 flacons de 25 ml de culture de cellules. Ceux-ci sont gardés en observation pendant 7 jours. Après récolte, les cellules sont suspendues dans le milieu et soumises à plusieurs cycles de congélation-décongélation, suivis d'une centrifugation et d'une filtration, puis le filtrat est inoculé en culture cellulaire fraîche et observé pendant 7 jours. On ne doit relever aucun signe d'ECP et aucune hémadSORption de globules rouges de poulet.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et d'absence de contaminants biologiques peuvent être trouvés au Chapitre 1.1.9.

b) Innocuité

Après réhydratation, 10 doses de vaccin fibrome lyophilisé sont injectées par voie sous-cutanée chez 3 lapins sensibles qui sont mis en observation pendant 21 jours. Les réactions locales doivent être légères sans généralisation ni effet sur l'état de santé général.

Le vaccin Myxome est testé en utilisant 10 doses injectées par voie intradermique dans les oreilles de 3 lapins sensibles maintenus en observation pendant 21 jours. Le myxome primaire doit demeurer limité.

c) Activité

L'activité du lot est déterminée par mesure du contenu viral. Des dilutions en série du vaccin sont inoculées en culture de cellules sensibles. Une dose de vaccin doit contenir au moins le titre minimum établi dans la Section C.1.c.

Si la souche vaccinale n'est pas adaptée aux cultures, un test d'efficacité sera conduit (voir Section C.1.c).

d) Durée de l'immunité

Plusieurs groupes de 10 lapins sensibles sont vaccinés. Un groupe est éprouvé par infection virulente (comme dans le test d'efficacité du lot), à 1, 2, 3, etc., mois post-vaccination, pour le virus du fibrome de Shope, et à 1, 3, 6, et 9 mois, pour le virus myxomateux. La durée de l'immunité est déduite du temps durant lequel au moins 7 des 10 lapins se révèlent résistants à l'infection.

e) Stabilité

Les titres du virus vaccin sont déterminés périodiquement jusqu'à 3 mois après le temps de conservation revendiqué, sur au moins 3 lots de vaccin.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir Section C.4.b.

b) Activité

Voir Section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Arguello Villares J.L. (1986). CONTRIBUCIÓN A LA PROFILAXIS DE LA MIXOMATOSIS DEL CONEJO MEDIANTE EL USO DE UNA CÉLULA HOMÓLOGA. *MEDICINA VETERINARIA*, **3**, 91–103.
2. Arthur C.P. & Louzis C. (1988). A REVIEW OF MYXOMATOSIS AMONG RABBITS IN FRANCE. *REV. SCI. TECH. OFF. INT. EPIZ.*, **7**, 937–976.

3. Bertagnoli S., Gelfi J., Legall G., Boilletot E., Vautherot J.F., Rasschaert D., Laurent S., Petit F., Boucraut-Baralon C. & Milon A. (1996). PROTECTION AGAINST MYXOMATOSIS AND RABBIT VIRAL HEMORRHAGIC DISEASE WITH RECOMBINANT MYXOMA VIRUS EXPRESSING RABBIT HEMORRHAGIC DISEASE VIRUS CAPSID PROTEIN. *J. VIROL.*, **70**, 5061–5066.
4. Bradford M. (1976). A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTIFICATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING THE PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. *ANAL. BIOCHEM.*, **72**, 248–254.
5. Brun A., Saurat P., Gilbert Y., Godart A. & Bouquet J.F. (1981). DONNÉES ACTUELLES SUR L'ÉPIDÉMIOLOGIE, LA PATHOGENIE ET LA SYMPTOMATOLOGIE DE LA MYXOMATOSE. *REV. MED. VET.*, **132**, 585–590.
6. Chantal J., Boucraut-Baralon C., Ganiere J.P., Petit F., Py R. & Picavet D.P. (1993). RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT EN PLAQUES DE MICROTITRATION: APPLICATION À LA SÉROLOGIE DE LA MYXOMATOSE. ÉTUDE COMPARATIVE DES RÉSULTATS AVEC LA RÉACTION D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE. *REV. SCI. TECH. OFF. INT. EPIZ.*, **12**, 895–907.
7. Fenner F. (1994). MYXOMA VIRUS. *IN: VIRUS INFECTIONS OF VERTEBRATES, VOL. 5. VIRUS INFECTIONS OF RODENTS AND LAGOMORPHS*, OSTERHAUS A.D.M.E., ED. ELSEVIER SCIENCE B.V., AMSTERDAM, NETHERLANDS, 59–71.
8. Fenner F. & Ratcliffe F.N. (1965). MYXOMATOSIS. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, LONDON, UK.
9. Fenner F. & Woodroffe G.M. (1954). PROTECTION OF LABORATORY RABBITS AGAINST MYXOMATOSIS BY VACCINATION WITH FIBROMA VIRUS. *AUST. J. EXP. BIOL.*, **32**, 653–668.
10. Gelfi J., Chantal J., Phong T.T., Py R. & Boucraut-Baralon C. (1999). DEVELOPMENT OF AN ELISA FOR DETECTION OF MYXOMA VIRUS-SPECIFIC RABBIT ANTIBODIES; TEST EVALUATION FOR DIAGNOSTIC APPLICATIONS ON VACCINATED AND WILD RABBIT SERA. *J. VET. DIAGN. INVEST.*, **11**, 240–245.
11. Gilbert Y., Picavet D.P. & Chantal J. (1989). DIAGNOSTIC DE LA MYXOMATOSE: MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE. UTILISATION DE PRÉLÈVEMENTS SANGUINS SUR PAPIER BUVARD POUR LA RECHERCHE D'ANTICORPS. *REV. SCI. TECH. OFF. INT. EPIZ.*, **8**, 209–220.
12. Gorski J. & Mizak B. (1985). POLISH VACCINE AGAINST MYXOMATOSIS IN RABBITS. *MED. WETER.*, **41**, 113–116.
13. Jobert R. (1983). CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA VACCINATION CONTRE LA MYXOMATOSE, VACCINATION À L'AIDE DU VIRUS FIBROMATEUX. THÈSE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE TOULOUSE N° 82.
14. Joubert L. (1973). LA MYXOMATOSE T.II. SÉRIE : LES MALADIES ANIMALES À VIRUS. L'EXPANSION ÉDITEUR, PARIS, FRANCE.
15. Joubert L., Duclos P.H. & Tuailon P. (1982). LA MYXOMATOSE DES GARENNES DANS LE SUD-EST: LA MYXOMATOSE AMYXOMATEUSE. *REV. MED. VET.*, **133**, 739–753.
16. Marlier D., & Vindevogel H. (1996). LA MYXOMATOSE AMYXOMATEUSE: ISOLEMENT DE TROIS SOUCHES EN BELGIQUE. *ANN. MED. VET.*, **140**, 343–346.
17. Rodak L., Smid B., Valicek L. & Jurak E. (1985). COLLECTION OF MICROVOLUME BLOOD SAMPLES INTO GLASS CAPILLARIES FOR THE DETECTION OF ANTIBODY AGAINST AUJESZKY'S DISEASE VIRUS IN PIGS BY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) AND SOLID-PHASE RADIOIMMUNOASSAY (RIA). *ACTA VET. (BRNO)*, **54**, 207–216.
18. Rosell J.M., Gonzales J.L., Rueda A., Gallego E. & Flores J.M. (1984). MIXOMATOSIS ATÍPICA EN ESPAÑA. *MEDICINA VETERINARIA*, **1**, 401–412.
19. Saurat P., Chantal J., Ganiere J.P., Gilbert Y., Picavet D.P. & Lefort C. (1980). LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DANS LA MYXOMATOSE. ÉTUDE DE LA RÉPONSE HUMORALE. *BULL. MENS. OFF. NATION. CHASSE*, **12**, 297–309.
20. Saurat P., Gilbert Y. & Ganiere J.P. (1978). ÉTUDE D'UNE SOUCHE DE VIRUS MYXOMATEUX MODIFIÉ. *REV. MED. VET.*, **129**, 415–451.
21. Shope R.E. (1932). A FILTRABLE VIRUS CAUSING A TUMOR LIKE CONDITION IN RABBITS AND ITS RELATIONSHIP TO VIRUS MYXOMATOSIS. *J. EXP. MED.*, **56**, 803.
22. Sobey W.R., Conolly D. & Adams K.M. (1966). MYXOMATOSIS: A SIMPLE METHOD OF SAMPLING BLOOD AND TESTING FOR CIRCULATING SOLUBLE ANTIGENS OR ANTIBODIES TO THEM. *AUST. J. Sci.*, **28**, No. 9, 354.

23. Tozzini F. & Mani P. (1975). STUDIO SU ALCUNE CARRATERISTICHE DI CRESCITA DEL VIRUS DELLA MIXOMATOSI CEPPO PISA 73. *ARCH. VET. ITAL.*, **26**, 19–26.
24. Tozzini F. & Poli A. (1980). BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MYXOMATOSIS VIRUS STRAIN P73, AFTER 51 SERIAL PASSAGES ON RK13 CELLS. *ARCH. VET. ITAL.*, **31**, 48–51.
25. Von Der Ahe C., Dedek J. & Loepelmann H. (1981). ERGEBNISSE UND ERFAHRUNGEN IN DER DDR BEI DER STAATLICHEN PRÜFUNG UND PRAXISERPROPUNG DER AUS DER CSSR EMPORTIERTEN MYXOMATOSE-VAKZINE. *MONATSHE. VETERINARMED.*, **36**, 492–495.

*

* *

MALADIE HÉMORRAGIQUE DU LAPIN

RÉSUMÉ

*La maladie hémorragique du lapin (MHL) est une maladie mortelle fortement contagieuse et aiguë qui atteint le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) et est provoquée par un calicivirus. Une maladie semblable, dénommée syndrome du lièvre brun européen (EBHS), a été décrite chez les lièvres (*Lepus europaeus*). L'agent étiologique est un calicivirus différent, mais antigéniquement proche du virus de la MHL (RHDV pour Rabbit haemorrhagic disease virus). La MHL est caractérisée par une morbidité et une mortalité élevées (40 à 90 %), et se propage très rapidement par transmission directe ou indirecte. L'infection peut se produire par voie nasale, conjonctivale ou orale. La transmission de la MHL est facilitée par la stabilité élevée du virus dans l'environnement. La période d'incubation varie de 1 à 3 jours, et la mort se produit habituellement en 12 à 36 h après le début de l'hyperthermie. Les manifestations cliniques ont principalement été décrites pour l'infection aiguë (signes nerveux et respiratoires, apathie et anorexie). Les lésions sont spécifiques et évidentes, autant macroscopiquement que microscopiquement. On constate une nécrose hépatique et une coagulopathie intravasculaire disséminée (CIVD) massive dans tous les organes et les tissus. Les lésions les plus importantes se retrouvent dans le foie, la trachée et les poumons. Des pétéchies sont visibles dans presque tous les organes et sont accompagnées d'une diminution de la coagulation sanguine.*

Identification de l'agent pathogène : *le foie contient les titres viraux les plus élevés et est l'organe le plus approprié pour la mise en évidence du virus. Comme aucune condition de croissance satisfaisante ou milieu de culture de cellules sensibles n'a pu être établie, l'isolement in vitro ne peut être employé. Le test d'hémagglutination (HA) sur globules rouges humains du groupe sanguin O a été le premier test utilisé pour le diagnostic de routine en laboratoire de la MHL. Cependant d'autres tests (microscopie électronique indirecte, méthode immuno-enzymatique (ELISA), marquage immunohistologique, amplification en chaîne par polymérase (PCR) et Western Blot) ont montré des niveaux de sensibilité et de spécificité plus élevés.*

Épreuves sérologiques : *la caractérisation et le titrage des anticorps spécifiques résultant de l'infection normale ou de l'immunisation sont réalisés par inhibition de l'hémagglutination ou par ELISA, indirect ou de compétition. Les réactifs suivants sont préparés : antigène à partir de foie de lapin infecté, sérum anti-RHDV de lapins convalescents ou hyperimmunisés et sérum négatif de lapins sensibles à l'infection par le RHDV. Plusieurs laboratoires ont produit des anticorps monoclonaux (AcM). Quelques-uns ont produit un antigène recombinant, la protéine structurale VP60 exprimée en système baculovirus, antigène qui peut être employé à des fins diagnostiques.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *le contrôle indirect de la maladie est réalisé par la vaccination, en utilisant un vaccin inactivé préparé à partir de suspensions clarifiées de foie de lapins expérimentalement infectés, ensuite inactivées ainsi qu'adjuvées. Les animaux vaccinés produisent rapidement une immunité complète contre l'infection par le RHDV (et ceci dans les 5 à 10 jours). Les données expérimentales indiquent que la protection vaccinale peut s'étendre sur une longue période (plus de 1 an).*

A. INTRODUCTION

La maladie hémorragique du lapin (MHL) est une maladie mortelle fortement contagieuse et aiguë des lapins européens sauvages et domestiques (*Oryctolagus cuniculus*).

La MHL a été rapportée pour la première fois en 1984 en République Populaire de Chine (26) ; actuellement elle a été signalée dans plus de 40 pays en Asie, en Amérique centrale, en Europe et en Océanie. Des épizooties ont également été enregistrées au Mexique, en Arabie Saoudite ainsi qu'en Afrique du Nord et de l'Ouest. En 2000 et 2001, 3 épizooties indépendantes ont été enregistrées aux États-Unis d'Amérique. À la fin de l'année 2004, elle a aussi été rapportée en Uruguay et en 2005 encore aux États-Unis. La MHL est enzootique dans la plupart des régions du monde.

L'agent causal de la MHL est un calicivirus de 32 à 35 nm de diamètre et sa capsid est constituée d'un polypeptide unique (60 kDa), son génome est constitué d'un ARN de 7437 kb et un ARN sous-génomique de 2,2 kb (8, 28, 29, 33). La protéine de capsid (VP60) du virus de la MHL (RHDV) se compose de deux domaines distincts liés par une région charnière : les résidus en positions 200-250 de la partie N-terminale constituent le domaine intérieur et les résidus au-delà des positions 200-250, c'est-à-dire de la partie C-terminale, constituent le domaine saillant. Dans l'image globale de la capsid, ces domaines forment une couche interne et une couche externe, cette dernière étant caractérisée par des structures en forme d'arche. Cette structure est également en corrélation avec les caractéristiques antigéniques du RHDV, et les déterminants antigéniques principaux sont situés dans la partie C-terminale de VP60 (3, 4, 35, 41).

Depuis 1991, un second type de particule virale a été identifié comme composant principal dans approximativement 5 % des échantillons RHDV-positifs, c'est-à-dire pris sur des lapins présentant une évolution longue de la maladie (7). Les caractéristiques de cette particule sont : i) une surface lisse et un diamètre plus petit que le RHDV ; ii) sa protéine est de 28 à 30 kDa ; iii) elle réagit avec les sérums de lapins convalescents de la MHL et avec des anticorps monoclonaux (AcM) anti-RHDV réagissant avec la partie N-terminale de la VP60 du RHDV, et iv) elle est négative à l'hémagglutination (HA). Cette particule virale plus petite correspond à la coque interne du RHDV, et 2 hypothèses ont été proposées pour expliquer son origine. Granzow *et al* (19) ont supposé qu'elle résultait du génome tronqué du RHDV ou d'une expression défectueuse de son génome. Cependant, Barbieri *et al.* (1) ont observé ce qui suit : i) une forte corrélation entre une présence plus grande de particules lisses de RHDV (s-RHDV) dans les organes et l'apparition d'IgM spécifiques anti-RHDV au jour 3 ou 4 post-infection ; ii) la présence de grandes quantités de s-RHDV dans le foie et la rate seuls et pas dans la circulation sanguine, comme cela se produit dans la phase de virémie de MHL aiguë ; et iii) la découverte de fragments de la VP60 ayant différentes masses moléculaires (41 à 30 kDa) durant la transition entre RHDV et s-RHDV. De cela, ils concluent que la genèse de la particule s-RHDV est due au processus de dégradation qui est probablement la conséquence du nettoyage physiologique des complexes immuns IgM-RHDV formés en grandes quantités lors du début de la réponse humorale. Indépendamment de son origine, l'identification de cette deuxième particule dans le foie peut être considérée comme un marqueur de la forme subaiguë/chronique de la MHL, qui évolue habituellement entre les jours 4 et 8 post-infection et est suivie de la mort du lapin ou, moins souvent, par son rétablissement (1).

La plupart des isolats viraux connus de MHL semblent appartenir à un seul sérotype. Les séquences complètes de souches du virus de la MHL d'origines géographiquement différentes ont été publiées. Les comparaisons révèlent une homologie assez proche en termes de séquence génomique avec peu ou pas de changements dans la composition en acides aminés (différences variant de 2 à 5 %). Néanmoins des isolats qui montrent des variations dépendant de la température de l'hémagglutination (2) ont été décrits, et plus récemment un variant génétique et antigénique du RHDV a été décrit simultanément en Italie (3) et en Allemagne (35). Ce variant RHDV, appelé RHDVa présente des changements en acides aminés 3 fois plus importants que dans les isolats précédemment séquencés, ceci en surface de la région exposée E (aa 344-434) qui contient les épitopes principaux des calicivirus. Un set d'anticorps donné qui protègent contre l'infection par le RHDV a été testé négativement par réaction immuno-enzymatique (ELISA) contre un antigène du RHDVa. Cependant, des lapins expérimentalement vaccinés avec le vaccin actuellement disponible contre le RHDV ont été protégés lors d'un challenge avec le RHDVa, même si c'était avec une efficacité inférieure (3, 35).

Une étude épidémiologique menée dans le but de comparer le taux de diffusion en Italie du RHDV et du RHDVa au cours des dernières années (24) a montré que le RHDVa est présent dans la plupart des régions d'Italie et qu'il remplace rapidement la « souche classique » de RHDV. En dehors d'Italie, le RHDVa a été reconnu pratiquement en même temps en Allemagne ; il a aussi provoqué les premières enzooties de MHL aux États-Unis pendant le printemps 2000, en Uruguay pendant l'hiver 2004 et encore aux États-Unis en 2005. Il a aussi été détecté en France (2000) et à Malte (2004), ce qui suggère que le RHDVa pourrait diffuser dans d'autres pays européens qui ont souffert de la maladie depuis de nombreuses années. Par ailleurs, en tenant compte des séquences génétiques du RHDV déposées dans la base de données NCBI, il semble que le RHDVa est aussi présent en République populaire de Chine.

Un autre virus, provisoirement appelé calicivirus du lapin (RCV) et apparenté au RHDV, a été identifié chez des lapins sains (5, 6). Il est significativement différent des isolats précédemment caractérisés de RHDV en terme de pouvoir pathogène, titrage viral, tropisme tissulaire et séquence primaire de la protéine structurale. Il est avirulent, se réplique dans l'intestin à un bas titre et a une homologie génomique d'environ 92 % avec le RHDV. Les résultats d'expériences de protection croisée indiquent que le RCV ne pourrait pas infecter les lièvres. En outre,

les données antigéniques et les comparaisons de séquence ont démontré qu'il est plus proche du RHDV que du virus du syndrome du lièvre brun européen (EBHSV) (5).

Un des résultats de l'emploi à grande échelle des tests sérologiques sur diverses populations de lapins est la preuve supplémentaire que, en plus du RCV, un ou plusieurs virus non pathogènes ressemblant au RHDV (RHDV-like) sont présents dans les populations de lapins sauvages dans une grande partie du sud-est de l'Australie et en Nouvelle-Zélande (11, 31, 34).

Des anticorps vis-à-vis de la MHL ont été détectés dans des sérums collectés en Europe entre 1975 et 1987, ce qui démontre que des virus RHDV-like étaient déjà présents mais n'avaient pas été détectés avant l'apparition des premiers symptômes de la maladie. De récents arguments sérologiques (taux élevés d'anticorps découverts dans des régions où la MHL n'a jamais été ni signalée ni suspectée) laissent à penser que des souches non-pathogènes circulent dans les populations de lapins sauvages en Europe (27).

Une étude conduite en Grande-Bretagne a montré que des particules d'ARN apparentées au RHDV étaient présentes dans les sérums récoltés depuis 1955, ce qui confirme que des virus RHDV-like existaient en Europe bien avant les premières preuves de l'existence de la MHL (30). Cependant, selon les auteurs (30, 40), le RHDV provoque une infection persistante chez les lapins possédant des anticorps spécifiques en l'absence de mortalité ; comme par ailleurs, la souche responsable ne pouvait pas être distinguée au plan phylogénétique des isolats pathogènes connus, les auteurs suggèrent que « de nombreuses – voire la plupart – des souches de RHDV pourraient se propager selon des modalités « pathogènes » ou « non-pathogènes ».

Le RHDV est très stable et résistant dans l'environnement. Le pouvoir infectieux du virus n'est réduit ni par traitement au chloroforme, ni par l'éther, ni par la trypsine, ni par exposition à pH 3, et ni par chauffage à 50 °C pendant 1 h. Le virus survit durant au moins 225 jours dans une suspension d'organe maintenue à 4 °C, au moins 105 jours à l'état déshydraté sur tissu à température ambiante, et au moins 2 jours à 60 °C, autant en suspension d'organe qu'à l'état déshydraté (36). Des travaux récents suggèrent que le RHDV peut survivre dans des carcasses de lapin sur le terrain pendant au moins 3 mois, tandis que le virus exposé directement aux conditions extérieures n'est viable que moins d'un mois (22). Il garde également son pouvoir infectieux à des températures basses, et reste tout à fait stable lors des processus de congélation/décongélation. Le RHDV est inactivé par l'hydroxyde de sodium à 1 % et par d'autres agents (par ex. l'eau de javel) qui causent la destruction des protéines virales par une augmentation du pH supérieure à 12. Le traitement à 4 °C par du formol entre 1 et 1,4 % ou par de la bêta-propiolactone entre 0,2 et 0,5 % inactive le virus mais n'altère pas son immunogénicité. Dès lors, une fois traités, les virus peuvent être utilisés pour la production de vaccins.

Le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) est la seule espèce connue à être infectée par la MHL. Aucun autre lagomorphe, tel le lapin du volcan du Mexique (*Romerolagus diazzi*), le lapin à queue noire (*Lepus californicus*) et le lapin de garenne d'Amérique du Nord (*Sylvilagus floridanus*), ne s'est avéré sensible (20). L'inoculation de suspension de tissus provenant de lapins infectés à 28 espèces différentes de vertébrés autres que les lapins a échoué à reproduire la maladie et aucune répllication du virus n'a été détectée par transcription inverse et amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) (18). Une maladie semblable, nommée le syndrome du lièvre brun européen (EBHS), a été décrite chez les lièvres (*Lepus europaeus*), mais son agent étiologique, qui est également un calicivirus, est différent du RHDV, bien qu'il lui soit antigéniquement apparenté. L'alignement des séquences d'ARN des génomes du EBHS et du RHDV montre une identité nucléotidique de 71 %, et l'alignement des acides aminés montre une identité de 78 % et une similitude de 87 % (41). L'infection croisée expérimentale de lapins avec l'EBHS et de lièvres avec le RHDV ne se produit pas (23). Des études récentes ayant tenté de démontrer la sensibilité du lapin à l'EBHSV ont indiqué une prévalence diffuse du virus dans une population sauvage de lapins de garenne et la possibilité d'induire une maladie clinique et une mortalité chez un petit nombre de ces lapins de garenne expérimentalement infectés (Lavazza données non publiées).

La MHL est caractérisée par une morbidité élevée et un taux de mortalité qui se situe entre 40 et 90 %. L'infection se produit chez les lapins de tout âge, mais la maladie clinique n'est seulement observée que chez les adultes et les jeunes animaux de plus de 40 ou 50 jours. Le mécanisme pathogénique de résistance des jeunes animaux est encore inconnu (7). Une différence a été observée dans la réponse inflammatoire cellulaire dans le foie d'adultes sensibles et de jeunes lapins résistants à la suite d'une infection par le RHDV. L'augmentation persistante des transaminases hépatiques à la suite d'une infection par le RHDV chez les jeunes lapins pourrait être un indicateur d'une infection subaiguë ou chronique, ce qui pourrait avoir des conséquences dans la transmission du virus (13, 14).

L'évolution clinique de la maladie peut être suraiguë, aiguë, subaiguë ou chronique. Les manifestations cliniques ont été décrites principalement pour l'infection aiguë, puisque habituellement il n'existe aucun signe clinique dans la forme suraiguë, et que la forme subaiguë est caractérisée par des signes similaires, mais plus légers. La période d'incubation varie de 1 à 3 jours ; la mort peut survenir 12 à 36 h après le début de la fièvre (> 40 °C). Pendant une épizootie, un nombre limité de lapins (5 à 10 %) pourra développer une forme chronique ou subaiguë de la maladie. Ces animaux meurent souvent 1 à 2 semaines plus tard, probablement suite à une dysfonction hépatique. Les lésions primaires sont de la nécrose hépatique et de la splénomégalie. Les lésions

pathologiques sont variables et peuvent être légères, elles incluent un foie friable, une augmentation des volumes du foie et de la rate, et une intense coagulopathie intravasculaire. Cette coagulopathie massive est généralement la cause d'hémorragies dans toute une série d'organes et d'une mort soudaine (20, 39). Dans la maladie subaiguë et la maladie chronique, un ictère des oreilles, de la conjonctive et des muqueuses est clairement évident.

Les signes cliniques et les lésions macroscopiques et microscopiques observés chez les lièvres atteints de EBHS sont très similaires à ceux décrits pour la MHL chez le lapin. À l'autopsie, les principales découvertes sont de l'œdème et de la congestion de la trachée avec un contenu hémorragique spumeux, de la dégénérescence hépatique, de la splénomégalie et un ictère généralisé (7). La maladie chez les lièvres dure légèrement plus longtemps et cause un taux de mortalité un peu plus bas (autour des 50 %) que la MHL chez le lapin ; le pic de mortalité chez des lièvres expérimentalement infectés est généralement observé entre 60 et 90 h post-infection.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Le foie contient le titre viral le plus élevé (de 10^3 DL₅₀ [dose létale 50 %] à $10^{6,5}$ DL₅₀) et est l'organe de choix pour l'identification virale du RHDV comme du EBHSV. La quantité de virus présente dans d'autres parties du corps est directement proportionnelle à la vascularisation ; ainsi la rate et le sérum peuvent servir de matériel alternatif de diagnostic quoique moins efficaces. Des niveaux plus élevés en particules sous-virales ont été signalés dans la rate plutôt que dans le foie de certains animaux morts de la forme subaiguë/chronique de la MHL (1). Le traitement initial de l'échantillon de diagnostic est presque identique quelque soit la méthode de diagnostic à appliquer, à l'exception des techniques d'immunomarquage. Un fragment d'organe est homogénéisé mécaniquement dans une solution physiologique tamponnée au phosphate à 5-20 % (w/v) (PBS), pH 7,2-7,4, filtré à l'aide de gaze et clarifié par centrifugation à 5 000 g pendant 15 min. À cette étape, le surnageant peut être directement examiné par un test d'hémagglutination (HA) ou par un ELISA. Si l'échantillon doit être examiné au microscope électronique (EM), il est envisageable de réaliser une seconde centrifugation à 12 000 g pendant 15 min, avant l'ultracentrifugation finale. Pour la détection par PCR, l'ARN viral contenu dans les échantillons peut être extrait des tissus homogénéisés non centrifugés.

Comme aucune condition de croissance satisfaisante n'a pu être établie, l'isolement *in vitro* du RHDV ou du EBHSV ne peut pas être inclus dans les méthodes de diagnostic. L'inoculation de suspensions de tissus de lapins infectés ne permet pas de reproduire la maladie et aucune répllication du virus n'a été détectée par la technique de la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) chez 28 espèces de vertébrés autres que le lapin (18). L'inoculation au lapin reste donc la seule manière d'isoler, de propager et de titrer le pouvoir infectieux du virus. Cependant, l'infection expérimentale n'est pas pratique comme méthode de diagnostic de routine, bien que cela puisse être utile dans le cas où des échantillons donneraient des résultats de tests équivoques (exemple : HA négatif/ELISA positif) ou pour le diagnostic initial dans des pays où la MHL n'est pas censée exister. L'infection expérimentale est cependant utile pour la production en grandes quantités d'antigènes viraux pour les réactifs diagnostiques et pour produire des vaccins inactivés.

Pour faire des essais expérimentaux réussis, les lapins concernés doivent être entièrement sensibles au virus, c'est-à-dire qu'ils devraient être âgés de 40 ou 50 jours et ne pas posséder d'anticorps spécifiques, même à bas titre. La MHL peut être reproduite par utilisation de suspensions de foie filtrées et traitées aux antibiotiques, inoculées soit par voie intramusculaire, soit par voie intraveineuse, soit *per os*. Quand la maladie est cliniquement évidente, les signes et les lésions *post mortem* sont identiques à ceux décrits pour une infection naturelle. Une augmentation de la température corporelle est enregistrée entre 18 et 24 h post-infection, suivie, aux alentours de 70 à 90 % des cas, de mort entre 24 et 72 h post-infection. Quelques individus peuvent survivre jusqu'à 6 jours après l'infection. Les animaux qui surmontent la maladie montrent seulement une hyperthermie transitoire, de l'abattement et de l'anorexie, mais présentent une forte séroconversion saisissante qui peut être facilement détectée 4 à 6 jours après l'infection.

a) Test d'hémagglutination

L'HA a été le premier test utilisé pour le diagnostic de laboratoire en routine de la MHL (26). Il devrait être réalisé avec des globules rouges (GR) humains de groupe O, fraîchement collectés, stockés toute une nuit dans de la solution d'Alsever, et lavés avec du PBS à 0,85 % et à pH 6,5 (gamme de 6-7,2). L'HA est moins évidente voire inexistante lorsque des GRs d'autres espèces sont utilisés. Les GRs lavés sont suspendus dans du PBS à 0,75 %. Une dilution double du surnageant clarifié d'un homogénat à 10 % de tissus de foie ou de rate est incubé avec un volume égal de GRs lavés dans une plaque de microtitrage scellée à 4 °C, de préférence. Après 1 h (entre 20 min et 2 h) d'incubation, l'hémagglutination à une dilution > à 1/160 est considérée comme positive. Des titres moins élevés pourraient être considérés comme douteux, et

devraient être vérifiés par d'autres méthodes. Aux alentours de 10 % des échantillons sont positifs par ELISA ou microscopie électronique, mais donnent des résultats négatifs au test d'hémagglutination (HA faux négatifs). Certains isolats de RHDV peuvent montrer des différences dépendant de la température dans leurs caractéristiques d'hémagglutination (2) et pourraient montrer une activité HA seulement lorsque le test est réalisé à 4 °C. Néanmoins les faux négatifs au HA sont principalement détectés dans les organes de lapins montrant une forme subaiguë/chronique de la maladie et cela dépend des caractéristiques des particules lisses, tronquées de RHDV.

Les organes de lièvres donnent rarement un titre significatif quand le protocole HA RHDV est utilisé. Pour mettre en évidence une activité HA dans des organes provenant de lapins infectés par le EBHSV, une procédure modifiée doit être adoptée : toutes les étapes sont effectuées à 4 °C, la suspension d'organe est traitée avec un volume égal de chloroforme, et les GRs ne sont pas utilisés à un pH plus élevé que 6,5 (7). Même avec cette méthode, environ 50 % seulement des échantillons donnent un résultat positif, car cette maladie est le plus souvent subaiguë ou chronique chez les lièvres et que le virus doit donc avoir les caractéristiques antigéniques et structurales typiques des particules s-RHDV (7).

En raison de la difficulté pratique d'obtenir et de conserver des cellules sanguines humaines du groupe O, ainsi que du risque de travailler avec ces cellules, et de la difficulté d'obtenir des résultats répétables, ce test a été remplacé par la détection du virus par ELISA.

b) Microscopie électronique

La microscopie électronique en coloration négative peut être réalisée par la méthode dite « méthode de la goutte ». Une grille recouverte de formvar/carbone est placée sur une goutte de suspension d'organe (préparée de la façon décrite dans la section B.1), et laissée pendant 5 min. Après avoir enlevé l'excès de fluide avec le bord d'un morceau de papier filtre déchiré, la grille est laissée, flottant sur une goutte à 2 % de phosphotungstate de sodium (NaPT), pH 6,8, pendant 1,5 min. L'excès de coloration est enlevé et la grille peut être observée à un grossissement de 25 000.

Du fait de la faible sensibilité de la méthode de la goutte, il est envisageable de centrifuger l'échantillon dans le but de concentrer les particules virales. Le culot obtenu après ultracentrifugation d'au moins 100 000 *g* pendant 30 min ou, alternativement en utilisant une Beckman Airfuge à 21 psi durant 5 min est resuspendu dans du PBS ou de l'eau distillée, déposé sur une grille pendant quelques minutes, et ensuite coloré tel que décrit par avant. Les virions de la MHL sont visibles sous forme de particules sans membrane, de 32 à 35 nm de diamètre, présentant une structure interne (25 à 27 nm de diamètre), délimitée par un anneau duquel radient 10 petites projections périphériques à distribution régulière. Les particules lisses (s-RHDV) sont identifiées par la perte complète des portions externes, devenant parfaitement hexagonales et plus petites, avec seulement l'anneau de la capsid visible (1, 7, 19).

Dans le but de réaliser un diagnostic, notamment lorsque les autres méthodes donnent des résultats douteux, la meilleure méthode microscopique est une technique immuno-électromicroscopique (IEM). Cette méthode utilise soit un sérum hyperimmun anti-RHDV, obtenu de lapin ou d'autres espèces, soit des AcMs spécifiques, qui sont incubés avec un volume équivalent de l'échantillon pendant 1 h à 37 °C avant ultracentrifugation. La réaction immunologique induit l'agglutination des particules virales dans un agrégat qui est rapidement et aisément identifié à l'EM. Les méthodes immunologiques utilisant l'or sont également appliquées pour mieux visualiser les virions et les protéines virales.

L'EBHSV peut aussi être identifié dans des échantillons diagnostiques par examen en EM. En outre, la méthode IEM utilisant du sérum convalescent anti-EBHSV ou des AcMs spécifiques anti-EBHS peut être appliquée pour identifier l'EBHSV. En utilisant des antisérums spécifiques pour l'EBHSV et le RHDV, il est possible de différencier les deux virus.

c) Méthodes immuno-enzymatiques

La détection de virus par un ELISA se fonde sur une technique de type « sandwich » et beaucoup de techniques dérivées ont été décrites. Une procédure utilise les réactifs, solutions, temps et température qui sont employées dans l'ELISA de compétition (c-ELISA) pour la sérologie (voir section B.2.b), excepté que la concentration en Tween 20 est 2 fois plus importante (0,1 % [v/v]). La microplaque utilisée doit avoir de bonnes capacités d'absorption (par exemple Nunc Maxisorp immunoplate). L'homogénat de foie est resuspendu à 10 % (w/v) dans du PBS classique ; 50 µl est le volume de base à utiliser à chaque étape. Le tampon d'ELISA utilisé pour toutes les étapes est du PBS avec 1 % d'extrait de levure (ou l'albumine sérique bovine [BSA]), et du Tween 20 0,1 %, pH 7,4. Toutes les étapes d'incubation durent de 50 à 60 min à 37 °C en agitation douce. Après toutes ces étapes, 3 lavages de 3 à 5 min doivent être réalisés en employant du PBS avec du Tween 20 0,1 %. Des homogénats de foie de lapin positif et négatif pour la MHL doivent être utilisés comme témoins. La peroxydase de raifort (HRPO) peut être couplée à des IgG purifiées d'un sérum polyclonal ou à des AcMs (voir section B.2.b). Les AcMs anti-RHDV ont été produits dans plusieurs laboratoires et peuvent être utilisés à la place de sérums polyclonaux. Plus récemment, des AcMs

reconnaissant des épitopes spécifiques exprimés seulement par le variant RHDVa ont été également produits (Capucci, données personnelles).

Pour mieux caractériser l'antigénicité des isolats de virus de la MHL par un ELISA sandwich, il est envisageable de tester chaque échantillon 4 fois, et d'utiliser 4 conjugués HRPO différents, par exemple 2 AcMs reconnaissant le même déterminant antigénique présent à la surface du virus et exprimé soit par la souche classique soit par le variant RHDVa, un sérum hyperimmun anti-RHDV polyclonal (qui pourrait identifier des « nouveaux variants potentiels » ou des virus apparentés, comme le EBHSV) et un pool d'AcMs reconnaissant des épitopes internes qui peut détecter les particules s-RHDV lisses, dégradées telles que le EBHSV. Un ELISA de capture d'antigène alternatif utilisant des anticorps anti-RHDV de moutons comme anticorps de capture et un AcM pour la détection du RHDV a été décrit (10).

• Protocole (exemple)

Pour les étapes qui ne sont pas indiquées spécifiquement, voir la procédure du c-ELISA pour la sérologie (section B.2.b.).

- i) Sensibiliser la plaque avec un sérum hyperimmun anti-RHDV et un sérum RHDV négatif, le dernier servant de témoin vis-à-vis de réactions non spécifiques (échantillons faux positifs). Pour chaque échantillon, 4 puits doivent être sensibilisés avec le sérum positif et 4 puits avec le négatif.
- ii) Diluer l'extrait de foie au 1/5 et au 1/30 (2 répliques pour chaque dilution) dans le tampon d'ELISA (voir ci-dessus), directement dans les puits de la plaque (par exemple ajouter 45 µl du tampon dans tous les puits de la plaque, ajouter 10 µl de l'échantillon dans les deux premiers puits et ensuite, après basculement, transférer 9 µl dans le second puits). Traiter les témoins, aussi bien le positif que le négatif, de la même façon que les échantillons.
- iii) Après incubation et lavage (voir ci-dessus), incuber avec le conjugué HRPO.
- iv) Après une dernière série de lavages, ajouter le substrat chromogénique. L'orthophénylènediamine (OPD) doit être utilisée comme substrat de la peroxydase pour le développement final de la réaction. Employer du tampon 0,15 M de citrate phosphate, pH 5,0, avec 0,5 mg/ml d'OPD et 0,02 % de H₂O₂. La réaction est arrêtée après 5 min par addition de 50 µl de H₂SO₄ 1 M.
- v) L'absorbance est lue à 492 nm. Les échantillons positifs sont ceux montrant une différence > 0,3 dans l'absorbance, entre les puits recouverts avec du sérum RHDV-positif et ceux recouverts avec du sérum négatif. Habituellement, à la dilution 1/30, les échantillons positifs récoltés de lapins présentant la forme classique aiguë de la MHL donnent une valeur d'absorbance > 0,8, tandis que la valeur des échantillons négatifs, à la dilution 1/5, varie de 0,1 à 0,25.

Pour le diagnostic de l'EBHSV, il est possible d'utiliser cet ELISA sandwich RHDV-spécifique, mais, du fait de la forte différence antigénique existant entre les 2 virus, il y a un risque d'obtenir des résultats faux négatifs. De plus, l'adoption d'une technique d'ELISA sandwich spécifique à l'EBHSV utilisant autant un sérum de lièvre anti-EBHSV positif à haut titre, ou réagissant avec des AcMs RHDV (4, 7), ou des AcMs EBHSV spécifiques, à la place de sérum de lapin, est fortement recommandée (7).

d) Immunomarquage

Des tissus fixés dans du formol tamponné à 10 % et incorporés dans de la paraffine peuvent être immunomarkés en utilisant une méthode avec de la peroxydase à complexe avidine-biotine (ABC). Les coupes sont d'abord déparaffinées dans du xylène et de l'alcool, contre-marquées avec de l'hématoxyline pendant 1 min et rincée avec de l'eau du robinet. Elles sont ensuite mises dans un bain de méthanol contenant de l'H₂O₂ 3 % et lavées avec du PBS, 3 fois, pendant 5 min à chaque lavage. Pour limiter le bruit de fond dû aux liaisons non spécifiques des anticorps, les échantillons sont incubés avec du sérum normal de lapin pendant 1 h à température ambiante avant addition de biotine. Les coupes sont incubées toute la nuit dans une chambre humide à température ambiante avec du sérum biotinylé anti-RHDV de lapin ou des AcMs, puis sont lavées comme décrit auparavant et incubées encore pendant 30 min à 37 °C avec une peroxydase ABC. Les coupes sont ensuite lavées 3 fois. De l'amino-éthyl-carbazole est utilisé comme substrat. Enfin, les coupes sont rincées à l'eau du robinet et montées (37).

Un intense marquage des noyaux et un marquage cytoplasmique diffus des cellules nécrotiques du foie, principalement dans les régions périportales, sont caractéristiques et spécifiques. Un marquage positif des macrophages et des cellules de Kupffer est aussi observé, tout comme des réactions hépatocellulaires. Des réactions positives sont aussi détectées dans les macrophages des poumons, de la rate et des nœuds lymphatiques, ainsi que dans les cellules rénales mésangiales (37).

Des cryosections de tissus fixées dans du méthanol peuvent être directement immunomarquées par incubation pendant 1 h avec du sérum anti-RHDV de lapin conjugué à la fluorescéine ou des AcMs. De la fluorescence spécifique peu être détectée dans le foie, la rate et les glomérules rénaux.

e) Épreuve Western Blot

Lorsque les autres tests tels que l'HA ou l'ELISA donnent des résultats douteux (faible positivité) ou que les échantillons sont suspectés contenir des particules s-RHDV, l'analyse par une épreuve de Western Blot est utile pour poser le diagnostic final.

Les échantillons homogénéisés sont préparés comme décrit précédemment, et les particules virales sont par la suite concentrées (10 fois) par ultracentrifugation (100 000 *g* pendant 90 min) à travers un coussin de sucrose à 20 % (w/w).

Le surnageant ainsi que le culot peuvent être examinés pour détecter, respectivement, la sous-unité 6S du RHDV (4) et la protéine structurale VP60 dénaturée du RHDV ou un de ses fragments de protéolyse, dont la taille peut varier de 50 à 28 kDa. Un échantillon témoin positif et un négatif devraient être systématiquement utilisés.

Les protéines du RHDV peuvent être mises en évidence avec des anticorps polyclonaux ou des AcMs. Si des AcMs sont utilisés, ils pourraient reconnaître des épitopes continus. Les AcMs spécifiques identifiant un épitope interne ou caché pourraient être également utilisés pour détecter l'EBHSV. Un sérum hyperimmun anti-RHDV de lapin est moins efficace que des AcMs afin de reconnaître le même profil de bande (5).

Les protéines de l'échantillon sont dénaturées durant 2 min à 100 °C en présence de Tris 60 mM, pH 6,8, de sodium dodécyl sulfate (SDS) 2 %, de bêta-mercapto-éthanol 2 %, et de glycérol 5 %, séparées sur du SDS/PAGE 10 % (gel d'électrophorèse en polyacrylamide), et ensuite transférées par électroblotting à des membranes de nitrocellulose ou de PVDF (fluorure de polyvinylidène), dans du Tris 25 mM, de la glycine 192 mM pH 8,3 et du méthanol 20 % (v/v) à 1,5 A pendant 1 h avec refroidissement ou à 0,15 A toute la nuit. Après le transfert, les membranes sont saturées pendant 30 à 60 min avec de l'albumine sérique bovine (BSA) 2 %, dissoute dans du tampon phosphate, pH 7,4, et incubées pendant 2 h à température ambiante avec le sérum approprié dilué dans du tampon phosphate, pH 7,4, et de la BSA 1 %. Les filtres sont lavés complètement avec du PBS et sont incubés pendant 1 h avec des immunoglobulines anti-espèce marquées à la phosphatase alcaline à une dilution prédéterminée par titrage. Finalement, les filtres sont encore lavés et le substrat chromogène (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate nitro blue tétrazolium) est ajouté.

Les échantillons positifs et le témoin positif produiront un modèle identique à celui des protéines de poids moléculaire, respectivement de 60 kDa (la protéine structurale simple de RHDV) ou 41 à 28 kDa (le fragment de la VP60 associé à la transition de RHDV vers s-RHDV), lorsque l'on examine le culot et 6 kDa (sous-unité) lorsque l'on examine le surnageant.

L'analyse par Western Blot peut aussi être utilisée pour identifier l'EBHSV. Le protocole du test est identique. Le modèle de bandes protéiques, détectées en employant un sérum polyclonal anti-EBHSV ou des AcMs anti-RHDV croisant, est similaire. Cependant, le pourcentage d'échantillons montrant de la dégradation virale est plus grand et donc des fragments de poids moléculaire inférieur, provenant de la protéine structurale VP60, sont souvent observés.

f) Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques

L'application de la RT-PCR pour la détection d'acides nucléiques RHDV-spécifiques a été décrite par plusieurs auteurs (18, 21). Du fait du faible niveau de variation dans les séquences des isolats du RHDV et la haute sensibilité de la PCR, la transcription reverse suivie d'une PCR (RT-PCR) constitue le test de diagnostic direct idéal pour la MHL. Cette méthode est appliquée sur des échantillons d'organes (le foie de préférence), d'urine, de fèces et de sérum en utilisant différentes amorces oligonucléotidiques dérivées de la région génomique codant la capsid (région N-terminale). L'ADNc obtenu de la réaction de RT est habituellement amplifié par PCR comme décrit par Guittre *et al.* (21). Pour révéler le produit de PCR, le milieu de réaction d'amplification d'ADN est chargé sur un gel d'agarose pour électrophorèse. Si besoin, la spécificité du produit de PCR peut être déterminée par séquençage ou Southern blot et hybridation avec une sonde interne marquée avec un isotope radioactif. Une méthode similaire de RT-PCR a été utilisée pour identifier un RCV non pathogène (3). Plusieurs amorces, spécifiques pour le gène de la polymérase du RHDV et complémentaires à des gènes de la protéine VP60 et de l'ORF2, sont utilisées et les fragments amplifiés sont analysables par Southern Blot. La RT-PCR constitue une méthode extrêmement sensible pour la détection du RHDV, et est 10⁴ fois plus sensible que l'ELISA (21). Elle n'est pas strictement nécessaire pour le diagnostic de routine mais elle plus sensible, appropriée et rapide que les autres tests.

De même, une RT-PCR a été employée pour la détection et la caractérisation de souches du EBHSV (25, 32). Une RT-PCR multiplex en temps réel utilisant des sondes TaqMan et des standards externes pour la quantification de l'ARN a été récemment mise au point comme test supplémentaire pour la détection du RHDV. Cette épreuve présente une sensibilité de 100 %, une sensibilité analytique de 10 copies par puits et une linéarité allant de 10^1 à 10^{10} copies. Cette méthode a été utilisée pour quantifier l'ARN du RHDV lors d'infections expérimentales de lapins vaccinés et chez des lapins convalescents d'une MHL (15, 16).

Une technique d'hybridation *in situ* utilisant autant des sondes ADN sens et antisens a été développée pour rechercher la présence de RHDV dans des échantillons de tissus (17). Cette méthode est très sensible et peut être utilisée pour le diagnostic précoce de MHL puisqu'il donne des résultats positifs dès 6 à 8 h après l'infection. Cependant, elle est coûteuse et difficile à effectuer, et est donc principalement indiquée pour les études de recherche.

2. Épreuves sérologiques

L'infection par le RHDV peut être diagnostiquée par une détection de la réponse spécifique en anticorps. La réponse humorale ayant une grande importance dans la protection de l'animal face à la MHL, la détermination du titre en anticorps spécifiques après vaccination ou chez les animaux convalescents est prédictive de la capacité d'un lapin à résister à l'infection par le RHDV.

Trois techniques de base sont appliquées pour le diagnostic sérologique du RHDV : l'inhibition d'hémagglutination (IH) (26), l'ELISA indirect (i-ELISA) et le c-ELISA (7). Chacune de ces méthodes a des avantages et des inconvénients. En tenant compte de la disponibilité en réactifs et de la complexité technique pour effectuer ces tests, l'IH est la méthode la plus commode, suivie par le i-ELISA et le c-ELISA, respectivement. D'un autre côté, les 2 ELISA sont plus rapides et plus faciles que l'IH, particulièrement lorsqu'un grand nombre d'échantillons sont testés. La spécificité du c-ELISA est nettement plus grande que celle atteinte avec les deux autres méthodes (7). Une méthode alternative c-ELISA a été décrite (9). Pour une meilleure interprétation sérologique et un meilleur classement du statut immunologique des lapins, une combinaison de techniques ELISA distinguant les réponses en anticorps IgA, IgM, et IgG est également disponible.

D'autres tests (Capucci, données non publiées, 12) peuvent être utilisées pour des recherches particulières et lorsqu'un haut niveau de sensibilité est nécessaire pour détecter des anticorps dans des espèces non-cibles ou des anticorps induits par réaction croisée avec des antigènes similaires au RHDV (voir section A – Introduction).

Ces tests incluent :

- *i-ELISA* : l'antigène est fixé à la phase solide via un AcM spécifique du RHDV (1H8). Il a une sensibilité légèrement plus élevée que le c-ELISA, rendant possible la détection d'anticorps impliqués dans les réactions croisées et de faible avidité.
- *ELISA en phase solide (SP-ELISA)* : l'antigène purifié est directement adsorbé à la phase solide et du fait de la déformation du virus, les épitopes internes sont exposés. Par conséquent il détecte un spectre plus large d'anticorps et a une plus haute sensibilité et une plus faible spécificité.
- *ELISA sandwich pour la détection des IgM et des IgG dans les échantillons de foie et de rate préalablement examinés par des tests virologiques* : un tel test est particulièrement utile quand la détection du virus est difficile notamment pour les tests diagnostics sur les animaux qui meurent de la forme chronique de la maladie. Dans ce cas, un haut niveau d'IgM spécifique du RHDV et un niveau faible voir inexistant d'IgG sont les signes d'une infection par la MHL.

a) Inhibition de l'hémagglutination

Antigène : l'antigène est préparé en utilisant des foies de lapins infectés prélevés rapidement après leur mort. Le foie est homogénéisé dans du PBS 10 % (w/v), pH 6,4, et clarifié par 2 centrifugations consécutives à faible vitesse (500 *g* pendant 20 min et 6 000 *g* pendant 30 min). Le surnageant, prélevé des tubes de telle sorte à éviter la couche superficielle des lipides, est filtré à travers une membrane à pores de 0,22 µm, titré par HA, et enfin réparti en aliquots, qui sont stockés à -70 °C.

Échantillons de sérum : avant d'être testés, les sérums sont inactivés par incubation à 56 °C pendant 30 min. Les sérums sont ensuite traités avec du kaolin 25 % (dilution finale du sérum : 1/10) à 25 °C pendant 20 min et centrifugés. Ceci est suivi par un second traitement au kaolin, également à 25 °C pendant 20 min, cette fois avec un volume de 1/10 de GR humains de groupe O agglutinés à 50 %. Ceux-ci sont collectés frais, gardés toute une nuit dans de la solution d'Alsever et lavés dans du PBS 0,85 %, pH 6,5. Les sérums sont clarifiés par centrifugation.

- **Protocole**

- i) Placer 50 µl de sérum dans le premier puits d'une plaque de microtitrage et faire des dilutions doubles dans les puits 2 à 8 en utilisant du PBS et de la BSA 0,05 %.
- ii) Ajouter 25 µl d'antigène RHDV contenant 8 unités HA à chaque puits et incuber la plaque à 25 °C pendant 30 à 60 min.
- iii) Ajouter 25 µl de globules rouges de groupe O à une concentration de 2 à 3 % à chaque puits et laisser reposer à 25 °C pendant 30 à 60 min.
- iv) Titrer l'antigène avec chaque test pour vérifier que 8 HA/25 µl ont été utilisés et inclure des sérums témoins positif et négatif.

Le titre du sérum est la dernière dilution montrant une inhibition de HA. Le seuil positif des titres sériques est corrélé au titre des sérums témoins négatifs ; cela varie habituellement de 1/20 à 1/80.

En raison de la difficulté pratique d'obtenir et de conserver des globules rouges humains de groupe O et le risque de travailler avec ceux-ci et du fait de la difficulté d'obtenir des résultats confirmés, ce test tend à être remplacé par un ELISA.

b) ELISA de compétition

Antigène : une souche de référence internationale n'est pas encore disponible ; néanmoins, comme un seul sérotype a été identifié jusqu'ici à travers le monde, des résultats fiables peuvent être obtenus par différents laboratoires utilisant chacun son propre virus de référence. Même les anticorps induits par les variants identifiés de RHDV sont reconnus par la méthode de référence décrite ici. De plus, le test peut aussi facilement détecter les anticorps venant d'une infection de lapins avec le RCV non pathogène, du fait de sa haute corrélation génétique avec le RHDV (5, 6).

L'antigène peut être préparé comme décrit auparavant pour l'IH (section B.2.a), en prenant comme précaution de le conserver à -20 °C dans du glycérol à 50 % (v/v) pour éviter le gel. Si nécessaire, le virus peut être inactivé avant l'addition de glycérol, en utilisant de l'éthylèneimine binaire (BEI) à 33 °C pendant 24 h. L'antigène peut être pré-titré par ELISA et après être utilisé comme agent limitant : par exemple la dilution correspondant 60 à 70 % de la taille plateau (valeur d'absorbance à 492 nm dans la gamme 1,1–1,3).

Sérum anti-RHDV : des sérums spécifiques polyclonaux ayant de hauts titres anti-RHDV peuvent être obtenus de différentes manières. Deux voies actuellement utilisées sont décrites ci-dessous :

- i) des lapins sont infectés avec un extrait à 10 % de foie RHDV-positif dilué au 1/100 dans du PBS pour obtenir des sérums de convalescence (21 à 25 jours) contenant un haut niveau d'IgG anti-RHDV. Comme le taux de mortalité lié au RHDV est haut, il est nécessaire d'infecter au moins 10 à 15 lapins séronégatifs ou d'infecter des lapins qui ne sont que partiellement protégés (par exemple 4 à 8 lapins infectés dans les 3 à 7 jours post-vaccination. Les lapins qui survivent à l'infection 21 à 25 jours post infection doivent être saignés afin d'obtenir du sérum en phase de convalescence. Au lieu de saigner tout de suite les lapins, il est possible de les inoculer à nouveau 3 à 4 mois après l'infection initiale puis de les saigner 10 à 15 jours plus tard pour obtenir des sérums hyperimmuns contre le RHDV.
- ii) le RHDV est purifié à partir des foies des lapins infectés expérimentalement qui meurent d'une forme aiguë de la maladie (entre 28 et 40 h après l'infection), en utilisant une des méthodes qui ont été publiées (4, 7, 8, 28, 33). Après, le RHDV purifié peut être utilisé pour immuniser des moutons ou des chèvres en accord avec des protocoles classiques utilisant un adjuvant huileux. La même procédure peut aussi être utilisée pour inoculer des lapins si le virus purifié est inactivé avant l'inoculation.

Les AcMs anti-RHDV pourraient être utilisés à la place du sérum polyclonal. La purification d'IgG de lapin et leur conjugaison à l'HRPO peuvent être réalisées suivant les protocoles de référence. L'anticorps conjugué est titré par un ELISA sandwich en présence ou en absence d'antigène de RHDV (foie de lapin négatif). Il est ensuite utilisé à la plus haute dilution montrant un maximum (haut plateau) d'absorbance (si le sérum avait un bon titre anti-RHDV, la valeur du conjugué HRPO devrait se situer entre 1/1 000 et 1/3 000).

Sérums témoins : le sérum négatif est prélevé sur lapins entièrement sensibles à l'infection par le RHDV. Le sérum positif est soit un sérum convalescent dilué au 1/100 dans un sérum négatif ou un sérum récolté sur un animal vacciné.

• **Protocole (exemple)**

- i) Le sérum de lapin anti-RHDV dilué à un titre prédéterminé, par exemple 1/5 000 dans du tampon carbonate/bicarbonate 0,05 M, pH 9,6, est adsorbé sur une microplaque ELISA de haute capacité d'adsorption (par exemple une immunoplaque Nunc Maxisorb) à 4 °C toute une nuit ;
- ii) Laver la plaque 3 fois pendant 3 à 5 min chaque fois dans du PBS pH 7,4, avec du Tween 20 à 0,05 % (PBST). Lorsque les plaques ne sont pas utilisées immédiatement, elles peuvent être conservées, fermées dans un sac en plastique, pendant 1 mois à –20 °C ;
- iii) Distribuer 25 µl de PBST avec 1 % d'extrait de levure (PBSTY) ou 1 % de BSA (PBST-BSA) dans chaque puits nécessaire de la plaque (voir ci-dessous). Ajouter 7 µl du premier échantillon de sérum aux 2 premiers puits (A1 et B1), 7 µl du second sérum aux 2 seconds puits (C1 et D1), et continuer avec le 3^e (E1 et F1) et le 4^e (G1 et H1) sérum, et compléter ainsi la première colonne. Si des données qualitatives sont nécessaires (positives /négatives), répéter l'opération dans la seconde colonne avec les échantillons de sérum de 5 à 8, et dans la 3^e colonne avec les échantillons de 9 à 12, et ainsi de suite. Si le titre du sérum nécessite d'être déterminé, ce sérum peut être dilué par la suite. Agiter la plaque, et utiliser une micropipette à 8 voies pour transférer 7 µl des puits de la colonne 1 vers les puits de la colonne 2. Cela correspond à une dilution 4 fois du sérum. Cette dernière opération peut être répétée 1 fois (titre 1/160), 2 fois (titre 1/640) ; ou 4 fois (titre 1/10 240). Même dans le cas de testage de sérum pour des données qualitatives (une seule dilution), ou pour obtenir un titre final (plusieurs dilutions), compléter les 12 puits restants libres de chaque plaque avec les sérums témoins. Ajouter 7 µl de sérums positifs aux puits G7 et H7, et 7 µl de sérums négatifs aux puits G10 et H10, ensuite les diluer 1 ou 2 fois (1/40 à 1/160) ;
- iv) Ajouter 25 µl par puits d'antigène suspendu dans du PBSTY à tous les puits de la plaque, à une dilution double de la dilution décidée, comme décrit dans la section « antigène » (voir la première partie de la description de la méthode ELISA) ;
- v) Incuber la plaque à 37 °C sur une plateforme oscillante pendant 50 à 60 min ;
- vi) Laver la plaque comme décrit dans l'étape ii) ;
- vii) Ajouter 50 µl par puits d'IgG anti-RHDV de lapins conjugués avec l'HRPO à la dilution décidée, comme décrit ci-dessus dans la section « sérum anti-RHDV » (voir la première partie de la description de ce test ELISA) ;
- viii) Incuber la plaque à 37 °C sur une plateforme oscillante pendant 50 à 60 min, et laver comme décrit à l'étape ii) en ajoutant un quatrième lavage de 3 min ;
- ix) Utiliser 50 µl par puits d'OPD comme donneur d'hydrogène dans les conditions suivantes : 0,5 mg/ml d'OPD dans 0,15 M de tampon phosphate/citrate, pH 5, et 0,02 % de H₂O₂. Arrêter la réaction après 5 min par addition de 50 µl par puits de H₂SO₄ 1 M ;
- x) Lire la plaque avec un spectrophotomètre en utilisant un filtre de 492 nm.

Le sérum est considéré comme négatif lorsque la valeur d'absorbance de la première dilution (1/10) diminue de moins de 15 % par rapport à la valeur de référence (dilution au 1/10 du sérum témoin négatif), tandis qu'il est considéré positif lorsque la valeur d'absorbance diminue d'au moins 25 % ou plus. Lorsque la valeur d'absorbance de la dilution 1/10 diminue entre 15 % et 25 % de la valeur de référence, le sérum est considéré comme douteux.

Le titre du sérum correspond à la dilution donnant une valeur d'absorbance égale à 50 % (± 10) de la valeur moyenne des 3 dilutions du sérum négatif.

Un large éventail de titres peut être détecté, et ceci selon la provenance de l'échantillon. Les sérums positifs varient de 1/640 à 1/10 240 chez les lapins convalescents, de 1/80 à 1/640 chez les lapins vaccinés et de 1/10 à 1/160 en cas d'infection non pathogène. La connaissance de l'origine des échantillons laisse le choix de réaliser le test sur une ou plusieurs dilutions. Tester seulement la première dilution donne un résultat positif ou négatif. Le titre est établi en testant toutes les dilutions, jusqu'à la sixième.

En raison des différences antigéniques significatives existant entre le RHDV et le EBHSV (8, 30), les techniques sérologiques décrites ci-dessus, qui utilisent le RHDV comme antigène, ne sont pas recommandées pour le diagnostic sérologique de l'EBHS. Malgré cela, une méthode ELISA directe pourrait être employée pour la détection des sérums de lièvres positifs et négatifs pour l'EBHSV ; en fait, l'adsorption du RHDV dans la phase solide d'une plaque d'ELISA expose à des réactions antigéniques croisées. Alternativement, un c-ELISA spécifique pour l'EBHSV peut être développé de manière similaire, en utilisant des réactifs spécifiques (antigènes et antisérums) préparés comme décrit ci-dessus pour le RHDV.

c) ELISA d'isotypes (iso-ELISAs)

Ces ELISAs permettent la détection et le titrage des isotypes IgA, IgM et IgG (6). Le titre des isotypes est critique pour l'interprétation en sérologie de terrain dans 4 domaines courants : les anticorps croissants, la résistance des jeunes lapins, les anticorps maternels, les anticorps chez des lapins précédemment infectés (12).

Pour détecter les IgG RHDV-spécifiques, un AcM RHDV-spécifique est adsorbé sur une plaque Maxisorp à une concentration de 2 µg/ml par une méthode décrite plus haut pour le sérum polyclonal dans le c-ELISA (voir section B.2.b, étape de procédure de test i). Le virus est ajouté aux plaques à une concentration double de celle utilisée dans le c-ELISA et après incubation et lavage, les sérums sont ajoutés et dilués en série 4 fois en partant de la dilution 1/40. Un AcM IgG anti-lapin conjugué HRPO est utilisé pour détecter des IgG liées au virus. L'étape finale pour les iso-ELISAs pour IgG, IgM et IgA est l'addition d'OPD et de H₂SO₄ comme pour le c-ELISA. Pour détecter les isotypes IgM et IgA, les phases de la réaction de l'ELISA sont inversées de façon à éviter la compétition avec les IgG, qui est habituellement l'isotype prédominant. L'AcM IgG anti-lapin ou l'IgA anti-lapin est adsorbé aux puits et ensuite les sérums sont dilués comme décrit plus haut. L'incubation avec l'antigène suit et l'AcM HRPO-conjugué est ensuite utilisé pour détecter le RHDV lié aux plaques. Les sérums sont considérés être positifs si la valeur d'OD₄₉₂ (densité optique) à la dilution 1/40 est plus importante de 0,2 unités de DO (2 déviations standard) que la valeur du sérum témoin négatif. Le titre de chaque sérum est pris comme la dernière dilution donnant une valeur positive. Étant donné que les tests iso-ELISA ne suivent pas une méthodologie identique, des titres équivalents n'impliquent pas que les isotypes soient présents en quantités identiques.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Dans les pays où la MHL est enzootique, le contrôle indirect de la maladie est réalisé par la vaccination en employant le type approprié de vaccin – un vaccin qui est préparé à partir d'une suspension clarifiée de foie de lapins expérimentalement infectés, et qui est par la suite inactivée et adjuvée. Les méthodes d'inactivation (formol, béta-proprionolactone et autres substances) et les adjuvants utilisés (huile minérale incomplète ou hydroxyde d'aluminium), peuvent varier suivant le protocole utilisé par les différents producteurs.

Dans les 10 dernières années, plusieurs études ont été effectuées pour faire exprimer la protéine de capsid du RHDV par *Escherichia coli*, par le virus de la vaccine, et par un virus de la myxomatose atténué (MV). Malgré cela, il a été démontré par différents auteurs qu'une protéine de capsid recombinante, VP60, exprimée dans le système d'expression baculovirus/cellules Sf9, s'assemblait avec d'autres pour former des *virus-like particles* (VLPs) qui sont structurellement et antigéniquement identiques aux virions de la MHL. Alors que la protéine de fusion exprimée en *E. coli* est hautement insoluble et faiblement immunogène, une immunisation active peut être réalisée avec des VLPs obtenues dans le système baculovirus ou en utilisant du virus vaccinia, le MV et un canarypox, administré soit par voie orale soit par voie intramusculaire. En particulier, des lapins vaccinés avec un MV recombinant exprimant la protéine de capsid du RHDV ont été protégés contre la maladie hémorragique mortelle et des épreuves virulentes avec le MV. Le virus recombinant résultant était aussi capable de se propager par voie horizontale et d'induire une protection en cas de contact des animaux, et donc de fournir une opportunité de protéger une population de lapins sauvages (38). Pareillement, l'immunogénicité de VLPs administrées oralement comme alternative à l'immunisation parentérale offre une voie économique et pratique pour administrer un vaccin pour l'immunisation de masse d'animaux sauvages.

Plus récemment, la protéine structurale VP60 a été exprimée en plante transgénique, soit avec un nouveau vecteur basé sur le poxvirus de la prune (PPV-NK), soit par des plantes de pommes de terre sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur ou d'un promoteur 35S modifié. Dans les deux cas, l'immunisation de lapins avec des extraits de plantes de *Nicotiana glauca* infectées avec des chimères PPV-NK VP60 ainsi qu'avec des extraits de feuilles de pommes de terre portant ce promoteur 35S modifié, respectivement, induisait une réponse immune efficace qui protégeait les animaux contre une épreuve létale avec le RHDV. Cependant, à l'heure actuelle, des vaccins recombinants ne sont pas encore enregistrés ni disponibles dans le commerce.

En France, un vaccin (*Dercunimix*[®], Merial) a récemment été commercialisé, celui-ci est une combinaison d'un vaccin traditionnel de MHL inactivé dérivé de foie et un vaccin de virus de la myxomatose vivant atténué, qui peut être administré par voie intradermique.

Le programme habituel est d'administrer le virus inactivé 2 fois à intervalle de minimum 2 semaines. Normalement, une dose de 1 ml est inoculée par voie sous-cutanée dans la région du cou. Dans les unités sans antécédent de maladie, où l'anamnèse pour la MHL est négative, il est envisageable de ne vacciner que les individus destinés à la reproduction ; la première injection est faite vers 2 à 3 mois. Une revaccination annuelle

est fortement recommandée pour assurer un bon niveau de protection, même si des données expérimentales indiquent que la protection perdure habituellement assez longtemps (plus de 1 an). La vaccination des animaux de boucherie n'est pas nécessaire si la maladie ne s'est pas produite dans l'élevage. Après une épizootie de MHL, même si une hygiène stricte et des mesures sanitaires, incluant le lavage et la désinfection, un traitement sûr des carcasses et un vide sanitaire, ont été adoptées, il est fortement recommandé de vacciner les animaux de boucherie à l'âge de 40 jours, parce que l'incidence de réinfection est très forte. Il est seulement envisageable d'arrêter la vaccination des animaux de boucherie après plusieurs cycles de production. De façon à vérifier la persistance de MHL contagieuse à l'intérieur de l'unité, un nombre variable de lapins, en commençant avec un petit groupe d'animaux sentinelles, pourraient ne pas être vaccinés.

Les animaux vaccinés produisent rapidement une forte immunité contre l'infection par le RHDV, la vaccination est donc considérée efficace pour protéger des lapins non-exposés et elle sera utilisée en premier lieu dans les élevages de lapins après qu'une épizootie de la maladie ait été diagnostiquée ; une fois que la MHL a été confirmée chez des lapins malades ou morts, les animaux restant en bonne santé sont immédiatement vaccinés.

L'administration de sérum immun est aussi efficace pour produire une protection rapide, de courte durée, contre l'infection par le RHDV.

Les vaccins devraient être stockés entre 2 et 8 °C et ne devraient pas être congelés, ni exposés à la lumière du jour ni à de hautes températures.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Le lot de semence pour la production de vaccins inactivés sur tissus est constitué d'homogénats de foies infectés obtenus par passages successifs chez des lapins qui ont été inoculés avec une suspension virale de MHL partiellement purifiée. Le dernier est obtenu en centrifugeant à 10 000 *g* pendant 20 min à 4 °C une suspension 1/5 de foie (v/v) dans du PBS. Le surnageant qui en résulte est traité toute une nuit à 4 °C avec du polyéthylène glycol (PEG 6000) à 8 % (v/v). Le culot est resuspendu à une dilution 1/10 dans du PBS, et ensuite centrifugé à 10 000 *g* pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant est alors ultracentrifugé à 80 000 *g* pendant 2 h à 4 °C à travers un coussin à 20 % de sucrose. Le culot est resuspendu dans du PBS (1/100 du volume de départ). Cette suspension virale est ensuite caractérisée par examen au microscope électronique en coloration négative, par détermination de sa réactivité en ELISA, et de sa capacité d'HA à température ambiante en élution lente (le titre HA vis-à-vis de globules rouges humains du groupe O est supérieur à 1/1 280). Le lot de semence est titré avant usage et devrait contenir au moins 10⁵ DL₅₀. Il devrait être conservé au congélateur (-70 °C) ou lyophilisé.

b) Méthode de culture

À l'heure actuelle, la réplication du RHDV ne peut être obtenue que chez des animaux sensibles. Les lapins utilisés pour l'inoculation sont sélectionnés à partir de lignées réputées sensibles à la maladie par le biais de dosages sérologiques périodiques. Les animaux (âgés d'au moins 4 mois) doivent être maintenus en quarantaine stricte dès leur arrivée, dans une aire séparée et être élevés dans des conditions de santé satisfaisantes (voir la partie consacrée aux animaux de laboratoire dans le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries »). La propagation de la semence et la production de groupes vaccinés relèvent du même protocole que l'infection expérimentale, incluant une injection intramusculaire d'une dose d'au moins 100 DL₅₀.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Le lot de semence utilisé pour la production du vaccin doit être exempt de toute contamination par d'autres virus, bactéries, mycoplasmes et champignons. Le lot de semence est contrôlé par inoculation directe à des lapins sensibles suivie d'une évaluation des signes cliniques au cours de l'infection expérimentale. Un lot de semence souhaitable devrait causer la mort chez 70 à 80 % des lapins dans les 24 à 72 h suivant l'inoculation, avec les lésions caractéristiques de MHL dans les organes internes. Pour valider le test, un examen rapide et histopathologique de tous les lapins devrait être réalisé dans le but d'exclure toute maladie intercurrente.

2. Méthode de fabrication

Suivant l'inoculation de lapins sensibles, le foie et la rate des lapins morts dans les 24 à 72 h après inoculation sont récoltés. Les organes sont hachés dans 1/10 (w/v) de PBS stérile, pH 7,2 à 7,4, et le mélange est homogénéisé pendant 10 min dans un mélangeur en environnement réfrigéré. Le mélange est ensuite traité avec du chloroforme 2 % (18 h à 4 °C), suivi d'une centrifugation à 6 000 *g* pendant 1 h à 4 °C. Le surnageant est récolté par pompage continu à haute pression et est plus tard inactivé. La suspension virale est analysée par le

test d'HA et par ELISA (voir section C.3) et, une fois que le nombre d'unités HA provenant du titrage initial est connu, du PBS stérile supplémentaire est ajouté en volume suffisant de façon à fournir, après inactivation et adsorption avec un adjuvant, une concentration de 640 à 1 280 HA unités/dose dans le produit commercial. Différents agents se sont révélés efficaces pour supprimer l'infectivité virale. Les plus fréquemment utilisés sont le formol et la bêta-proprionolactone, qui sont employés à différentes concentrations et différentes températures, pendant des périodes variables et en combinaison. Durant l'inactivation, il est envisageable d'agiter le fluide en continu. L'hydroxyde d'aluminium, l'adjuvant incomplet de Freund ou une autre émulsion huileuse est ensuite incorporé dans le vaccin comme adjuvant. Un agent de conservation, le thiomersal (merthiolate), est finalement ajouté à la dilution de 1/10 000 (v/v) avant la répartition dans les fioles.

3. Contrôles en cours de fabrication

Contenu en antigène : le titre du virus de la MHL est déterminé avant inactivation par calcul du titre HA, qui doit être supérieur à 1/1 280, et par la réactivité en ELISA. Les deux valeurs sont ensuite déterminées une nouvelle fois après inactivation et adsorption avec l'adjuvant. L'EM par coloration négative confirme l'identité du RHDV.

Stérilité : les organes sont testés pour l'absence de bactéries viables, de virus, de champignons ou de mycoplasmes par le même protocole que pour le virus souche. La solution de PBS et le gel d'hydroxyde d'aluminium sont stérilisés par autoclavage, l'émulsion huileuse est stérilisée par chauffage à 160 °C pendant 1 h.

Inactivation : avant l'incorporation de l'adjuvant, il faut prouver que l'agent inactivant et le processus d'inactivation inactivent le virus selon les conditions de fabrication. Ainsi, un test est pratiqué sur chaque étape aussi bien que sur le produit final. 5 lapins sont inoculés avec une dose de 2 ml de la suspension et 5 lapins non vaccinés sont gardés comme contrôles. Après 10 jours, une inactivation adéquate et l'absence d'effets secondaires sont démontrées par l'absence de signes cliniques et par des gains de poids similaires dans les deux groupes. À la fin des épreuves, les animaux sont sacrifiés et des extraits de foie sont testés par HA, ELISA et EM.

4. Contrôles de lots

Des tests de stérilité, de sûreté et d'activité devraient être réalisés sur chaque série de vaccin ; des tests de durée d'immunité devraient aussi être effectués lorsqu'on utilise une série type de vaccins, et des tests de stabilité devraient être effectués sur 3 séries.

a) Stérilité

Chaque lot de vaccin doit être testé pour l'absence de bactéries viables, de virus, de champignons ou de mycoplasmes en accord avec le même protocole que celui recommandé pour tester le lot de semence.

b) Innocuité

Dix lapins sont inoculés par la voie recommandée avec 3 fois la dose vaccinale. Les lapins sont observés pendant 3 semaines. Des réactions locales ou générales anormales ne doivent pas se développer.

c) Activité

Dix adultes séronégatifs âgés d'au moins 4 mois sont vaccinés avec une dose complète du vaccin administrée par la voie recommandée. Deux autres groupes de 5 animaux chacun sont vaccinés avec 1/4 et 1/16 de la dose complète, respectivement. Un quatrième groupe de 10 lapins non vaccinés est maintenu comme témoin. Tous les animaux sont éprouvés à 4 semaines après vaccination par inoculation intramusculaire d'une dose de RHDV contenant au moins 100 DL₅₀ ou présentant un titre HA supérieur à 1/2 560. Aucun lapin vacciné ne devrait montrer de signes d'infection, tandis que le taux de mortalité parmi les animaux témoins devrait être supérieur à 70 %. La réponse en anticorps de chaque animal vacciné est ensuite déterminée en référence avec les antisérums de référence titrés ; le niveau moyen en anticorps ne devrait pas être significativement inférieur au niveau enregistré dans le test de protection effectué en utilisant comme vaccin le lot de semence inactivée.

d) Durée d'immunité

Les données reportées dans la littérature indiquent une durée d'immunité à long terme induite par une seule vaccination (supérieure à 15 mois). Malgré cela, il est envisageable de pratiquer le test suivant : 20 lapins vaccinés 1 fois sont répartis en 4 groupes et sont testés sérologiquement à intervalle de 1 mois sur une période de 1 an. Chaque groupe est inoculé avec un RHDV virulent à 3, 6, 9 mois ou 1 an après vaccination (voir section C.4.c). L'épreuve virulente devrait produire une augmentation de la séroconversion, qui est directement reliée au temps qui s'est écoulé depuis la vaccination. L'absence de signes cliniques et de mortalité prouve l'efficacité du vaccin.

e) Stabilité

Il faut démontrer que le vaccin passe le test d'activité de lots 3 mois au-delà de sa durée de conservation.

f) Agents de conservation

Un agent de conservation est normalement requis pour un vaccin dans des flacons multidoses (voir Section C.2.). Sa persistance durant la durée de conservation devrait être vérifiée.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Lorsque des vaccins en suspension huileuse sont préparés, les personnes pratiquant la vaccination devraient être averties des risques et des conséquences d'une auto-injection, qui doit être traitée en urgence comme une blessure par pistolet graisseur.

5. Contrôles du produit fini

Les tests d'innocuité, d'efficacité et de stérilité du produit final doivent être réalisés après la mise en flacon et l'emballage. Ainsi, il est important que ces deux dernières étapes de fabrication soient réalisées selon de bonnes procédures normalisées. Les tests sont conduits en prélevant des échantillons d'un nombre statistiquement déterminé de flacons multidoses du vaccin pris au hasard (20 ou 100 doses).

a) Innocuité

Voir Section C.4.b.

b) Activité

Voir Section C.4.c.

c) Stérilité

Voir Section C.4.a.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BARBIERI I., LAVAZZA A., BROCCHI E., KONIG M. & CAPUCCI L. (1997). Morphological, structural and antigenic modifications of rabbit haemorrhagic disease virus in the course of the disease. Proceedings of the 1st Symposium on Calicivirus of the European Society of Veterinary Virology (ESVV), Reading, UK, 15–17 September 1996, 182–193.
2. CAPUCCI L., CHASEY D., LAVAZZA A. & WESTCOTT D. (1996). Preliminary characterisation of a non-haemagglutinating strain of rabbit haemorrhagic disease virus from the United Kingdom. *J. Vet. Med. [B]*, **43**, 245–250.
3. CAPUCCI L., FALLACARA F., GRAZIOLI S., LAVAZZA A., PACCIARINI M.L. & BROCCHI E. (1998). A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res.*, **58**, 115–126.
4. CAPUCCI L., FRIGOLI G., RONSHOLT L., LAVAZZA A., BROCCHI E. & ROSSI C. (1995). Antigenicity of the rabbit hemorrhagic disease virus studied by its reactivity with monoclonal antibodies. *Virus Res.*, **37**, 221–238.
5. CAPUCCI L., FUSI P., LAVAZZA A., PACCIARINI M.L. & ROSSI C. (1996). Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J. Virol.*, **70**, 8614–8623.
6. CAPUCCI L., NARDIN A. & LAVAZZA A. (1997). Seroconversion in an industrial unit of rabbits infected with a non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease-like virus. *Vet. Rec.*, **140**, 647–650.
7. CAPUCCI L., SCICLUNA M.T. & LAVAZZA A. (1991). Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and European brown hare syndrome. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **10**, 347–370.
8. CAPUCCI L., SCICLUNA M.T., LAVAZZA A. & BROCCHI E. (1990). Purificazione e caratterizzazione dell'agente eziologico della malattia emorragica virale del coniglio. *Sel. Vet.*, **31**, 301–312.

9. COLLINS B.J., WHITE J.R., LENGUAS C., BOYD V. & WESTBURY H.A. (1995). A competition ELISA for the detection of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Microbiol.*, **43**, 85–96.
10. COLLINS B.J., WHITE J.R., LENGUAS C., MORRISY C.J. & WESTBURY H.A. (1996) Presence of rabbit haemorrhagic disease virus antigen in rabbit tissues as revealed by a monoclonal antibody dependent capture ELISA. *J. Virol. Methods*, **58**, 145–154.
11. COOKE B.D., MCPHEE S., ROBINSON A.J. & L. CAPUCCI (2002). RHDV: does a pre-existing RHDV-like virus reduce the effectiveness of RHD as a biological control in Australia? *Wildlife Research*, **29**, 673–682
12. COOKE B.D., ROBINSON A.J., MERCHANT J.C., NARDIN A. & CAPUCCI L. (2000). Use of ELISAs in field studies of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in Australia. *Epidemiol. Infect.*, **124**, 563–576.
13. FERREIRA P.G., COSTA-E-SILVA A., MONTEIRO E., OLIVEIRA M.J. & AGUAS A.P. (2004) Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease. *Res Vet Sci.*, **76**, 83–94.
14. FERREIRA P.G., COSTA-E-SILVA A., OLIVEIRA M.J., MONTEIRO E. & AGUAS AP (2005). Leukocyte-hepatocyte interaction in calicivirus infection: differences between rabbits that are resistant or susceptible to rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Vet Immunol Immunopathol.*, **103**, 217–221.
15. GALL A., HOFFMANN B., TEIFKE J.P., LANGE B. & SCHIRRMAYER H. (2007). Persistence of viral RNA in rabbits which overcome an experimental RHDV infection detected by a highly sensitive multiplex real-time RT-PCR. *Vet. Microbiol.*, **120**, 17–32.
16. GALL A. & SCHIRRMAYER H. (2006). Persistence of rabbit haemorrhagic disease virus genome in vaccinated rabbits after experimental infection. *J. Vet. Med. [B]*, **53**, 358–362.
17. GELMETTI D., GRIECO V., ROSSI C., CAPUCCI L. & LAVAZZA A. (1998). Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by *in situ* hybridization with a digoxigenin labelled RNA-probe. *J. Virol. Methods*, **72**, 219–226.
18. GOULD A.R., KATTENBELT J.A., LENGHAUS C., MORRISY C., CHAMBERLAIN T., COLLINS B.J. & WESTBURY H.A. (1997). The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus (Czech strain V351): use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation. *Virus Res.*, **47**, 7–17.
19. GRANZOW H., WEILAND F., STREBELOW H.-G., LU C.M. & SCHIRRMAYER H. (1996). Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates. *Virus Res.*, **41**, 163–172.
20. GREGG D.A., HOUSE C., MEYER R. & BERNINGER M. (1991). Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **10**, 435–451.
21. GUITTRE C., BAGINSKI I., LE GALL G., PRAVE M., TREPO O. & COVA L. (1995). Detection of rabbit haemorrhagic disease virus isolates and sequence comparison of the N-terminus of the capsid protein gene by the polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.*, **58**, 128–132.
22. HENNING J., MEERS J., DAVIES P.R. & MORRIS R.S. (2005). Survival of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the environment. *Epidemiol Infect.*, **133**, 719–30.
23. LAVAZZA A., SCICLUNA M.T. & CAPUCCI L. (1996). Susceptibility of hares and rabbits to the European Brown Hare Syndrome Virus (EBHSV) and Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) under experimental conditions. *J. Vet. Med. [B]*, **43**, 401–410.
24. LAVAZZA A., CERRONE A., AGNOLETTI F., PERUGINI G., FIORETTI A., BOTTI G., BOZZONI G., CERIOLI M. & CAPUCCI L. (2004). An update on the presence and spreading in Italy of rabbit haemorrhagic disease virus and of its antigenic variant RHDVa. Proceeding of the 8th Congress of World Veterinary Rabbit Association (WRSA), Puebla, Mexico, 7–11 September 2004, 562–568.
25. LE GALL-RECLÉ G., ZWINGELSTEIN F., PORTEJOIE Y. & LE GALL G. (2001). Immunocapture-RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of rabbit haemorrhagic disease and european brown hare syndrome viruses. *J. Virol. Methods*, **97**, 49–57.

26. LIU S.J., XUE H.P., PU B.Q. & QIAN N.H. (1984). A new viral disease in rabbits. *Anim. Hus. Vet. Med.*, **16**, 253–255.
27. MARCHANDEAU S., LE GALL-RECULE G., BERTAGNOLI S., AUBINEAU J., BOTTI G. & LAVAZZA A. (2005). Serological evidence for a non-protective RHDV-like virus. *Vet. Res.*, **36**, 53–62.
28. MEYERS G., WIRBLICH C. & THIEL H.J. (1991). Rabbit haemorrhagic disease virus – molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology*, **184**, 664–676.
29. MEYERS G., WIRBLICH C. & THIEL H.J. (1991). Genomic and subgenomic RNAs of rabbit haemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology*, **184**, 677–686.
30. MOSS S.R., TURNER S.L., TROUT R.C., WHITE P.J., HUDSON P.J., DESAI A., ARMESTO M., FORRESTER N.L. & GOULD E.A. (2002). Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus. *J. Gen. Virol.*, **83**, 2461–2467.
31. NAGESHA H.S., MCCOLL K.A., COLLINS B.J., MORRISY C.J., WANG L.F. & WESTBURY (2000). The presence of cross-reactive antibodies to RHDV in Australian wild rabbits prior to the escape of the virus from quarantine. *Arch. Virol.*, **145**, 749–757.
32. NOWOTNY N., BASCUÑANA C.R., BALLAGI-PORDÁNY A., GAVIER-WIDÉN D., UHLÉN M. & BELÁK S. (1997). Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene. *Arch. Virol.*, **142**, 657–673.
33. OHLINGER R.F., HAAS B., MEYERS G., WEILAND F. & THIEL H.J. (1990). Identification and characterization of the virus causing rabbit haemorrhagic disease. *J. Virol.*, **64**, 3331–3336.
34. ROBINSON A.J., KIRKLAND P.D., FORRESTER R.I., CAPUCCI L. & COOKE B.D. (2002). Serological evidence for the presence of a calicivirus in Australian wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, before the introduction of RHDV: its potential influence on the specificity of a competitive ELISA for RHDV. *Wildl. Res.*, **29**, 655–662.
35. SCHIRRMAYER H., REIMANN I., KOLLNER B. & GRANZOW H. (1999). Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Arch. Virol.*, **144**, 719–735.
36. SMID B., VALICEK L., RODAK L., STEPANEK J. & JURAK E. (1991). Rabbit haemorrhagic disease: an investigation of some properties of the virus and evaluation of an inactivated vaccine. *Vet. Microbiol.*, **26**, 77–85.
37. STOERCKLE-BERGER N., KELLER-BERGER B., ACKERMANN M. & EHRENSPERGER F. (1992). Immunohistological diagnosis of rabbit haemorrhagic disease (RHD). *J. Vet. Med. [B]*, **39**, 237–245.
38. TORRES J.M., RAMIREZ M.A., MORALES M., BARCENA J., VAZQUEZ B., ESPUNA E., PAGES MANTE A. & SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (2000). Safety evaluation of a recombinant myxoma-RHDV virus inducing horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Vaccine*, **19**, 174–182.
39. UEDA K., PARK J.H., OCHIAI K. & ITAKURA C. (1992). Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease. *Jpn J. Vet. Res.*, **40**, 133–141.
40. WHITE P.J., TROUT R.C., MOSS S.R., DESAI A., ARMESTO M., FORRESTER N.L., GOULD E.A. & HUDSON P.J. (2004). Epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the United Kingdom: evidence for seasonal transmission by both virulent and avirulent modes of infection. *Epidemiol. Infect.*, **132**, 555–567.
41. WIRBLICH C., MEYERS G., OHLINGER V.F., CAPUCCI L., ESKENS U., HAAS B. & H.-J. THIEL (1994). European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit haemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *J. Virol.*, **68**, 5164–5173.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la Maladie hémorragique du lapin (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 2.7.

OVIDAE ET CAPRIDAE

CHAPITRE 2.7.1.

MALADIE DE LA FRONTIÈRE (« BORDER DISEASE »)

RÉSUMÉ

La maladie de la frontière, ou « Border disease » (BD), est une maladie virale des ovins et des caprins décrite pour la première fois en 1959 dans la région frontalière (« border ») séparant l'Angleterre du Pays de Galles, mais qui aujourd'hui est signalée dans le monde entier. Le virus est répandu dans le monde entier. Les taux de prévalence de la maladie de la frontière varient de 5 % à 50 % selon les pays et selon les régions d'un même pays. Stérilité des brebis, mortinatalité des agneaux et naissance d'agneaux chétifs constituent les principaux signes révélateurs de la maladie. Les agneaux malades peuvent présenter des tremblements, une conformation anormale et une toison hirsute : on les appelle « hairy-shaker » (trembleurs hirsutes) ou « fuzzy lambs » (agneaux crépus) et la maladie a parfois été désignée sous le nom « hairy shaker disease » (« maladie des trembleurs hirsutes »). La transmission verticale de la maladie joue un grand rôle dans l'épidémiologie de l'affection. L'infection des fœtus peut entraîner la naissance d'agneaux infectés persistants (IP). Ces agneaux IP présentent une virémie, n'ont pas d'anticorps et excrètent du virus en permanence. Ce virus passe d'un ovin à l'autre, les animaux IP étant la source d'infection la plus grave. L'infection des chèvres est moins fréquente et se traduit par de l'avortement. Dans de nombreuses régions, la cause la plus fréquente de BD est le pestivirus de la Border disease (BDV), mais dans d'autres régions du monde le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV pour Bovine Viral Diarrhoea Virus) peut être plus fréquemment en cause. La contagion des moutons par le BVDV est souvent consécutive à un contact étroit avec des bovins.

Il est important de repérer les animaux virémiques IP, de façon à les écarter de la reproduction et de la commercialisation. Les épreuves sérologiques ne suffisent pas. On considère généralement que les ovins possédant des anticorps, mais non virémiques, ne présentent pas de danger, car les animaux guéris ne sont pas porteurs latents du virus.

Identification de l'agent pathogène : *le virus de la BD (BDV pour Border Disease Virus) est un Pestivirus de la famille des Flaviviridae étroitement apparenté au virus de la peste porcine classique et au BVDV. Pratiquement aucun isolat de BDV ne présente de pouvoir cytopathogène en culture cellulaire. Il n'existe pas de sérotypes définis, mais les isolats viraux présentent une diversité considérable. Trois groupes antigéniques distincts et deux génotypes différents ont été identifiés.*

Des ovins IP ne présentant apparemment pas d'infection congénitale peuvent être repérés par isolement et immunocoloration en culture cellulaire de virus non-cytopathogène du sang ou du sérum. Les méthodes directes et rapides d'identification des ovins IP sont fondées sur la détection de l'antigène viral ou de l'ARN viral dans les leucocytes et sur la mise en évidence par immunohistochimie de l'antigène viral dans des biopsies cutanées. La mise en évidence du virus est moins fiable chez les agneaux âgés de moins de 2 mois qui ont ingéré des anticorps avec le colostrum. L'infection aiguë est généralement sub-clinique et la virémie est transitoire et difficile à détecter. L'isolement du virus à partir d'avortons ou d'agneaux mort-nés est difficile, tandis que les

tissus d'ovins IP contiennent une grande quantité de virus qui peuvent être facilement isolés ou mis en évidence par des méthodes directes.

Épreuves sérologiques : la meilleure façon de confirmer une infection aiguë par le BDV est de démontrer une séroconversion chez plusieurs animaux d'un même groupe dont on aura récolté du sérum à deux reprises ou plus. La technique immuno-enzymatique (ELISA) et le test de séroneutralisation virale sont les méthodes les plus courantes de recherche des anticorps.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : il n'existe pas de vaccin de référence de la BD, mais un vaccin à virus entier inactivé a été fabriqué et vendu. Dans l'idéal, ce vaccin devrait pouvoir être administré aux femelles avant la reproduction, de façon à éviter les infections transplacentaires. L'emploi d'un vaccin hétérologue du BVDV a été proposé, mais il faut tenir compte de la diversité antigénique des virus de la BD.

Des virus de la BD ont contaminé plusieurs vaccins à virus modifiés vivants à usage vétérinaire qui avaient été produits sur cellules ovines ou en présence de sérum de mouton. Ce risque potentiel devrait être connu des fabricants de produits biologiques.

A. INTRODUCTION

Le virus de la maladie de la frontière (BDV pour *Border Disease Virus*) est un *Pestivirus* de la famille des *Flaviviridae* étroitement apparenté au virus de la peste porcine classique (CSFV pour *Classical Swine Fever Virus*) et au virus de la diarrhée virale bovine (BVDV pour *Bovine Viral Diarrhoea Virus*). La taxonomie des *Pestivirus* pose problème à l'heure actuelle. Quatre espèces de *Pestivirus* sont officiellement reconnues, à savoir le CSFV, le BVDV types 1 et 2 et le BDV (20). Alors que les CSFV sont principalement inféodés au porc, les 3 autres virus ont été retrouvés chez les ovins, et plus particulièrement le BDV (29). A de rares exceptions près, pratiquement tous les isolats de BDV sont non-cytopathogènes (24). Le BDV se transmet naturellement entre ovins par voie oro-nasale et par transmission verticale. La BD est la principale maladie congénitale des ovins et des caprins, chez lesquels elle peut aussi entraîner des infections persistantes aiguës. La BD chez les chèvres est moins fréquente, l'infection persistante est rare et le principal signe est l'avortement. Les ovins peuvent être infectés par le BVDV à partir de bovins (6) et dans certains pays, le BVDV peut être plus fréquemment que le BDV l'agent étiologique responsable de la BD. Les porcs peuvent également être infectés par des pestivirus autres que le CSFV et des anticorps contre le BDV peuvent entraîner des interférences lors du diagnostic de la peste porcine classique (15). Plusieurs nouveaux virus de la BD isolés de moutons, de chèvres et de chamois des Pyrénées (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) ont été décrits récemment. Des analyses phylogénétiques qui utilisent l'analyse des séquences de nucléotides assistée par ordinateur laissent à penser que la variabilité génétique au sein des virus de la BD est plus grande que celle rencontrées dans les autres espèces de pestivirus. Quatre génogroupes distincts ont été décrits ainsi que d'autres génotypes potentiels retrouvés chez des moutons tunisiens et une chèvre (2, 28). Le virus de la BD du chamois est semblable aux virus isolés des moutons de la péninsule ibérique (22). Le présent chapitre traite de l'infection chez les ovins.

a) Infections aiguës

Les ovins adultes et nouveaux-nés exposés au BDV ne souffrent que d'une affection bénigne ou inapparente. Quatre à onze jours après leur contamination, les animaux présentent un peu de fièvre et une légère leucopénie, associées à une courte virémie et suivies de l'apparition d'anticorps circulants (19).

La meilleure façon de diagnostiquer les infections aiguës est de titrer les anticorps présents dans des sérums appariés prélevés chez un nombre représentatif d'ovins. L'infection par certains isolats de BDV peut entraîner une forte fièvre, une leucopénie sévère et prolongée, de l'anorexie, une conjonctivite, du jetage, de la dyspnée, de la diarrhée et une mortalité de 50 % chez les jeunes agneaux. En 1984, l'un de ces virus a été isolé au cours d'une sévère épizootie de BD chez des brebis laitières (7). Un second a contaminé un vaccin vivant de la peste porcine classique (31).

b) Infection du fœtus

Les principaux symptômes de la BD sont constatés chez les brebis gestantes. Alors que l'infection de la mère reste sub-clinique ou bénigne, ses conséquences sont graves pour le fœtus. Il peut mourir à n'importe quel stade de la gestation, mais le plus souvent à son début s'il a été infecté tôt. Les petits avortons peuvent être résorbés spontanément, ou être expulsés sans que l'on s'en aperçoive car les brebis continuent à manger normalement et ne semble pas souffrir. A l'approche de l'agnelage, on assiste à la mise-bas de fœtus plus gros ou d'agneaux mort-nés, ainsi qu'à la naissance d'agneaux faibles et de petite taille. La responsabilité du BDV dans un avortement ou une mortinatalité est souvent difficile à établir, bien que le virus puisse, dans certains cas, être isolé des enveloppes fœtales. Il est également possible de détecter le

virus par immunohistochimie dans l'encéphale, la thyroïde ou d'autres organes des avortons (21). Les anticorps de la BD doivent aussi être recherchés dans le liquide des enveloppes fœtales ou les sérums.

À l'agnelage, on constatera un nombre anormalement élevé de brebis stériles, mais ce sont les agneaux nés vivants et malades qui présenteront les symptômes les plus caractéristiques et les plus importants de BD. Les symptômes présentés par ces agneaux sont très variables et dépendent de la race d'ovins concernée, de la virulence de la souche de BDV et du moment où le troupeau a été infecté. Les agneaux atteints sont d'ordinaire petits et chétifs, beaucoup étant incapables de se tenir debout. Des symptômes nerveux ainsi que des anomalies de la toison sont souvent observés. Les symptômes nerveux restent les plus caractéristiques de la BD. Les tremblements vont de violentes contractions rythmiques des muscles du train et des membres postérieurs à des tremblements discrets et à peine perceptibles de la tête, des oreilles et de la queue. Les anomalies de la toison sont plus visibles chez les races à laine fine, qui présentent un pelage hirsute, en particulier au niveau de l'encolure et de la ligne du dos. Chez les agneaux atteints de BD, on peut aussi observer une pigmentation anormale, brune ou noire, de la toison laineuse. Les prélèvements de sang destinés à la recherche des anticorps du BDV seront effectués, sur anticoagulant, chez des agneaux suspects n'ayant pas encore ingéré de colostrum. Après ingestion de colostrum, il devient en effet difficile de détecter le virus avant que les agneaux aient atteint l'âge de 2 mois et que le titre de leurs anticorps maternels ait baissé. Toutefois, durant cette période, il reste possible de détecter l'antigène viral dans des biopsies cutanées par immunohistochimie et dans les leucocytes lavés par épreuve immuno-enzymatique (ELISA) ou par transcription réverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR).

Si l'on prend grand soin d'eux, un certain nombre d'agneaux atteints de BD peuvent être élevés, même s'ils sont susceptibles de mourir à tout âge. Les symptômes nerveux régressent peu à peu, et peuvent disparaître à l'âge de 3 à 6 mois. Faiblesse et vacillation du train postérieur, ainsi que de légers tremblements de la tête, peuvent réapparaître à l'occasion d'un stress. Les agneaux malades grandissent souvent lentement et, dans les conditions naturelles, nombre d'entre eux mourront avant le sevrage. Lorsque les pertes sont faibles au moment de l'agnelage et lorsque les agneaux ne présentent pas de signes évidents de BD, ces dernières observations pourront constituer une première alerte.

Certaines infections du fœtus survenant à peu près en milieu de gestation peuvent aboutir à la naissance d'agneaux présentant de graves symptômes nerveux, des troubles de la locomotion et des anomalies du squelette. Ces agneaux souffrent d'une hypoplasie et d'une dysplasie cérébelleuse, d'hydrocéphalie et de porencéphalie consécutives à une nécrose inflammatoire. Ces lésions très destructrices semblent être d'origine immunitaire, et les agneaux présentant de telles lésions ont souvent un titre élevé d'anticorps dirigés contre le BDV. La plupart des agneaux infectés en fin de gestation sont normaux et sains, et naissent indemnes d'infection virale, mais porteurs d'anticorps du BDV. Certains d'entre eux peuvent rester chétifs et mourir jeunes (1).

c) Virémie persistante

Lorsque les fœtus survivent à une infection survenant avant l'acquisition de l'immunocompétence, ils naissent avec une virémie persistante. Le fœtus ovin peut répondre pour la première fois à un stimulus antigénique entre le 60^e et le 85^e jour de la gestation, qui dure 150 jours. Chez les fœtus infectés avant l'apparition de la compétence immunitaire, la réplication virale n'est pas maîtrisée et 50 % des fœtus en meurent ordinairement. Chez les agneaux qui survivent à une infection en début de gestation, le virus est retrouvé dans tous les organes. Ces agneaux semblent être tolérants au virus et souffrent généralement toute leur vie d'une infection persistante. Du sang prélevé avant la prise de colostrum contiendra du virus, mais pas d'anticorps contre ce virus. L'absence de réaction inflammatoire est caractéristique de la maladie, les altérations tissulaires les plus caractéristiques étant retrouvées au niveau du système nerveux central (SNC) et de la peau. Le déficit en myéline constaté dans tout le SNC, est à l'origine des symptômes nerveux. Au niveau de la peau, les follicules pileux primaires augmentent de taille alors que le nombre de follicules pileux secondaires diminue, ce qui entraîne un hérissément ou un épaississement de la toison.

Les sujets virémiques persistants peuvent être reconnus par isolement/détection du virus dans un prélèvement de sang. La virémie est toujours facile à détecter, sauf durant les deux premiers mois de la vie, lorsque le virus est masqué par les anticorps colostraux ; cependant au cours de cette période, ce virus peut être tout de même retrouvé dans des leucocytes lavés. Certains de ces animaux développeront de faibles titres d'anticorps contre le BDV une fois âgés de plus de 4 ans (13). Bien qu'il soit difficile de détecter le virus dans le sang au cours d'une infection aiguë, la virémie persistante doit être confirmée par une seconde analyse, faite au plus tôt 3 semaines après la première.

Certains animaux virémiques survivent jusqu'à maturité sexuelle, et peuvent donc être utilisés pour la reproduction. Les agneaux nés de mères infectées resteront toujours virémiques. Ces sujets virémiques persistants représentent une source permanente de contagion pour les autres animaux et leur identification

est donc très importante dans tout programme de contrôle de la maladie. L'absence de virémie doit être démontrée chez les animaux commercialisés.

Les béliers IP ont un sperme de mauvaise qualité et fortement contaminé, et ils sont peu fertiles. Tout bélier reproducteur doit faire l'objet d'une prise de sang qui permettra de rechercher une infection persistante éventuelle par le BDV. Le virus peut être également recherché dans le sperme, bien que l'isolement du virus y soit moins facile qu'à partir du sang du fait de la toxicité du sperme pour les cultures cellulaires. La RT-PCR peut être intéressante pour détecter l'acide nucléique viral dans le sperme de certains béliers.

d) Maladie d'apparition retardée chez les ovins infectés virémiques persistants

Certains ovins IP, élevés séparément des autres animaux, sont atteints d'une diarrhée incoercible, dépérissent et présentent un jetage oculaire et nasal important parfois accompagné de détresse respiratoire. A l'autopsie de ces animaux, on découvre un épaississement très important de l'iléon distal, du caecum et du colon, consécutif à une entéropathie focale hypertrophiante. Du BDV cytopathogène peut être isolé de l'intestin de ces agneaux. En l'absence de toute source extérieure connue de virus cytopathogène, il est très probable qu'il provienne d'un réservoir existant chez l'agneau lui-même. Les autres animaux appartenant au même groupe ne développent pas la maladie. Ce syndrome, qui a aussi été observé sur le terrain dans certains foyers de BD et reproduit expérimentalement, ressemble en plusieurs points à celui de la maladie des muqueuses chez les bovins (13).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Il n'y a pas de Laboratoire de référence de l'OIE pour la BD, mais les Laboratoires de référence de la diarrhée virale bovine et de la peste porcine classique peuvent donner des conseils (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). L'une des méthodes qui s'est avérée la plus sensible pour identifier le BDV reste l'isolement du virus. L'immunofluorescence directe ou les autres techniques immunohistochimiques sur coupes congelées, ainsi que l'ELISA et la RT-PCR (classique ou en temps réel) sont également valables pour identifier les animaux infectés par le BDV.

a) Isolement du virus

Il est essentiel que les laboratoires qui entreprennent l'isolement du virus s'approvisionnent en cellules sensibles et en sérum de fœtus de veau garantis exempts de Pestivirus, ou leur équivalent, ces produits ne devant présenter ni activité pestivirale ni virus contaminant. Il est important que ces laboratoires soient sous assurance qualité.

Le virus peut être isolé sur de nombreuses cellules ovines, de première ou de seconde explantation, telles que cellules de reins, de testicules ou de poumons. Les lignées cellulaires ovines permettant la multiplication du BDV sont rares. Des lignées cellulaires semi continues, dérivées de muscle de fœtus d'agneau, d'embryon complet (19) ou de plexus choroïde de mouton peuvent s'avérer utiles, mais la sensibilité de ces différentes lignées au BDV varie considérablement. Les cellules ovines ont été employées avec succès pour isoler ou multiplier les BDV et les BVDV de types 1 et 2 d'origine ovine. Dans les régions où les moutons ont pu être infectés par du BDV d'origine bovine, c'est un système d'isolement du virus utilisant à la fois des cellules ovines et bovines qui pourrait être le meilleur. Plusieurs cultures de cellules bovines peuvent être conseillées, notamment les cellules testiculaires, les cellules embryonnaires de trachée ou de cornets olfactifs, ou encore de lignées cellulaires continues de rein de bovin. Toutefois, les cellules bovines ne sont pas suffisamment sensibles pour isoler ou multiplier certains BDV, et c'est pourquoi il ne faut pas compter uniquement sur elles.

Le virus infectieux peut être recherché dans le sérum des animaux vivants, mais la méthode la plus sensible pour confirmer une virémie à *Pestivirus* est de laver au moins 3 fois leurs leucocytes dans le milieu de culture, où ces leucocytes seront ensuite co-cultivés pendant 5 à 7 jours avec des cellules sensibles. Ces cellules subissent un cycle de congélation-décongélation, et une partie aliquote est utilisée pour un nouveau passage sur des cellules sensibles cultivées sur lames porte-objet, lames avec chambre ou plaques en plastique. Ces cellules sont colorées 3 à 4 jours plus tard, et la présence éventuelle de *Pestivirus* est recherchée par immunofluorescence ou test à la peroxydase. Les organes prélevés pour analyse sur l'animal mort doivent être placés dans un milieu de transport pour virus (10 % [poids/volume]). Au laboratoire, ces organes sont broyés, puis centrifugés pour éliminer les débris, et le surnageant est passé à travers un filtre de 0,45 µm. Les organes à partir desquels le virus est le plus facile à isoler sont la rate, la thyroïde, le thymus, les reins, l'encéphale, les nœuds lymphatiques et les intestins.

La présence du BDV peut être recherchée dans le sperme, mais le sperme complet est fortement cytotoxique et doit donc être dilué dans le milieu de culture cellulaire, en général à 1/10 au moins. Sachant que le sperme infecté le plus dangereux est celui des béliers IP, il est plus sûr de prélever le sang de ces derniers que leur sperme pour les identifier. Il existe de nombreuses variantes possibles d'isolement du virus. Elles doivent toutes être optimisées pour atteindre leur sensibilité maximale, en utilisant une préparation virale de référence normalisée et, autant que possible, des isolats de BDV obtenus récemment du terrain. Une méthode pratique et sensible d'isolement du virus en tubes à essai est résumée ci-dessous :

- i) Des tapis de cellules ovines sensibles obtenus, sub-confluentes ou juste confluentes, sont lavés au moins 2 fois dans une solution saline équilibrée de Hanks de façon à éliminer le milieu de culture avant de les inoculer avec environ 0,2 ml de prélèvement, que l'on laisse s'adsorber pendant 2 h à 37 °C ;
- ii) Les cultures sont lavées avec au moins 2 ml de milieu de culture. Ce dernier est rejeté et remplacé par un volume approprié de milieu d'entretien ;
- iii) Les cultures sont incubées pendant 5 à 7 jours à 37 °C. Elles sont examinées chaque jour au microscope, afin d'observer un effet cytopathogène (ECP) éventuel ;
- iv) Les cultures sont congelées à –70 °C puis décongelées, comme précédemment, et leur contenu est transféré sur d'autres cultures fraîchement préparées ;
- v) Les cellules cultivées sur verre sont récupérées 3 à 4 jours plus tard, fixées dans de l'acétone froid pendant 15 min, tandis que les cellules cultivées sur plastique sont fixées comme décrit ci-dessous (section sur la séroneutralisation virale [SN]). Les cellules fixées sont colorées en vue d'une épreuve d'immunofluorescence directe ou indirecte. Les témoins indispensables sont des cellules non inoculées, et des cellules inoculées avec des souches de BDV cytopathogènes et non-cytopathogènes ;
- vi) Les cellules sur lames sont examinées au microscope à UV afin d'observer une éventuelle, fluorescence cytoplasmique diffuse, qui est caractéristique des *Pestivirus*.

La coloration à l'immunopéroxydase peut aussi être utilisée avec des cellules multipliées sur des lames porte-objet, ou des cultures sur lamelles, ou des plaques de micro-titrage (voir ci-dessous la méthode de séroneutralisation virale). L'antigène viral peut également être recherché par la technique ELISA dans les cultures congelées et décongelées, à l'aide d'anticorps monoclonaux (AcM) dirigés contre les épitopes situés sur la protéine non-structurale bien conservée NS 2-3. En règle générale, la coloration détectera les virus non-cytopathogènes à la fin du premier passage, mais pour détecter les virus à multiplication lente sur des cellules faiblement permissives, il est recommandé de pratiquer deux passages.

b) Immunohistochimie

La présence de l'antigène viral peut être démontrée dans la plupart des organes d'animaux IP (4, 21). Cette démonstration doit être faite à l'aide d'anticorps appropriés, appliqués sur des coupes à congélation de tissus fixées par l'acétone ou sur des prélèvements inclus dans de la paraffine. Les anticorps dirigés contre tous les pestivirus, mais spécifiques vis-à-vis de NS 2-3 conviennent bien. Les organes qui contiennent une grande quantité d'antigène sont l'encéphale, la glande thyroïde et la muqueuse buccale. Les biopsies cutanées se sont révélées utiles pour le diagnostic *in vivo* des infections persistantes par le BDV.

c) Détection de l'antigène par ELISA

Le premier ELISA destiné à détecter un antigène pestiviral a été utilisé pour rechercher les ovins virémiques. Il a été modifié, depuis, en un double ELISA de capture par 2 anticorps monoclonaux, utilisable chez les ovins et les bovins. Deux AcMs de capture tapissent les puits d'une plaque de microtitrage et deux autres AcMs, conjugués à la peroxydase, servent d'anticorps révélateurs (9). Cette épreuve est très couramment employée pour identifier les moutons virémiques IP, à partir de leucocytes lavés provenant de leur sang lysé par un détergent. La sensibilité de cette épreuve est proche de celle de l'isolement viral, et c'est une méthode pratique pour trier un grand nombre de prélèvements de sang. Comme dans le cas de l'isolement du virus, de hauts titres d'anticorps colostraux peuvent masquer une virémie persistante. En présence d'anticorps, l'ELISA est plus efficace que l'isolement viral, mais peut donner de faux résultats négatifs chez les agneaux virémiques âgés de moins de 2 mois. Généralement, l'ELISA n'est pas assez sensible pour détecter des infections aiguës par le BDV dans des prélèvements de sang. De même qu'il est utilisé pour détecter le virus dans les leucocytes, l'ELISA peut aussi être utilisé sur des suspensions d'organes, en particulier la rate, de moutons IP suspects comme il peut constituer une alternative aux épreuves d'immunofluorescence et d'immunopéroxydase sur cultures cellulaires. Plusieurs méthodes ELISA de détection des *Pestivirus* ont été décrites et des kits de diagnostic permettant de détecter le BDV sont commercialisés. Les ELISAs qui utilisent des AcMs reconnaissant les épitopes de la protéine non-structurale NS 2-3, qui est conservée, devraient reconnaître toutes les souches de BDV. Les ELISAs qui reposent sur des AcMs reconnaissant les épitopes des protéines structurales, comme E^{ms}, et qui sont utilisés pour

détecter le BVDV chez les bovins ne conviennent pas pour le diagnostic de la virémie à BDV chez les moutons.

d) Méthodes de détection de l'acide nucléique

Les séquences génomiques complètes de 3 BDV ont été déterminées et comparées à celle d'autres *Pestivirus* (3, 17). L'analyse phylogénétique montre que les BDV sont plus étroitement apparentés au CSFV qu'au BVDV (2, 23, 28, 29). La RT-PCR est maintenant couramment utilisée pour le diagnostic des infections à *Pestivirus*. Différents types de RT-PCR sont décrits. Le protocole de la RT-PCR classique est le suivant :

- i) L'ARN total est extrait par le phénol-chloroforme, le TRIZOL et l'isothiocyanate de guanidine (GITC), par une colonne spin disponible dans le commerce ou par une technique de séparation immuno-magnétique.

NOTE : beaucoup de ces produits chimiques sont très toxiques ; il convient donc de suivre strictement les consignes de sécurité fournies par le fabricant.

- ii) La RT-PCR est réalisée en deux temps :

- a) Transcription réverse pour synthétiser l'ADNc à partir de l'ARN viral ;
- b) Amplification par PCR de l'ADNc pour produire des quantités facilement détectable d'ADN double-brin.

Cette procédure peut être réalisée soit au cours de deux réactions séparées, chacune dans un tube à PCR différent (RT-PCR en deux temps), soit cours des deux étapes d'une unique PCR à un tube (RT-PCR à un temps). Dans le système à deux temps, il est possible d'utiliser soit des hexamères randomisés soit des amorces spécifiques pour initier l'étape de transcription réverse, mais dans le système à un temps, seules des amorces spécifiques doivent être utilisées.

- iii) Le produit spécifique est détecté par une des techniques suivantes :

- a) Utilisation des amorces spécifiques du BDV dans la RT-PCR et visualisation après électrophorèse sur gel d'agarose, coloration au bromure d'éthidium et illumination aux rayons ultra-violet pour vérifier que l'amplicon a la taille requise.

NOTE : le bromure d'éthidium est très toxique ; il convient de se conformer aux recommandations du fabricant lors de la manipulation.

NOTE : l'illumination aux rayons ultra-violet doit être réalisée en prenant les précautions appropriées en vue de réduire les risques d'exposition cutanée.

- b) La PCR nichée qui utilise des amorces reconnaissant tous les pestivirus (habituellement dirigées vers la région 5'UTR) dans une première PCR suivie par une seconde PCR (nichée) avec des amorces spécifiques du BDV. Dans ce genre de tests, on compte classiquement environ 25 cycles au cours de la première PCR puis 30 à 35 cycles pendant la PCR nichée. Les amplicons sont détectés par visualisation après électrophorèse en gel d'agarose comme ci-dessus. Ces tests augmentent la spécificité et la sensibilité mais les risques de contamination sont élevés.
- c) La RT-PCR en temps réel qui utilise des amorces spécifiques du BDV et/ou une sonde oligonucléotidique marquée avec un fluorochrome pour détecter le virus. Les avantages de cette méthode consistent en sa spécificité et en sa capacité à réduire les contaminations. Il est aussi possible de réaliser une RT-PCR en temps réel sous forme nichée.

La construction des amorces et/ou des sondes oligonucléotidiques est d'une importance considérable pour le succès de ces techniques du fait de la grande variabilité génétique des isolats du BDV. Les amorces qui reconnaissent tous les pestivirus sont intéressantes pour dépister et typer toutes les espèces de *Pestivirus* (18, 27) ; elles peuvent aussi être associées à un séquençage quand c'est nécessaire pour la spécificité ou lors de recherches épidémiologiques. Des amorces spécifiques des BDV ont aussi été décrites (11, 30, 33). L'utilisation d'une RT-PCR en un seul tube scellé et de sondes fluorescentes réduit le risque de contaminations croisées entre les échantillons soumis pour diagnostic (12, 33). La mise au point de la RT-PCR en temps réel a permis simultanément la détection et le typage des pestivirus ovins (33). Les nombreuses applications de la RT-PCR comprennent la détection de l'ARN viral dans les tissus d'origine foétale et dans les composants des cultures cellulaires ou les vaccins (26) ; elles pourraient aussi se révéler intéressante pour la détection des virus en présence d'anticorps spécifiques anti-BDV. La validation de la RT-PCR est en cours. Les précautions à prendre lors de la réalisation d'une RT-PCR sont décrites 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 ».

2. Épreuves sérologiques

Les anticorps dirigés contre le BDV sont généralement détectés dans les sérums ovins par un test de séroneutralisation virale ou un ELISA. L'épreuve d'immunodiffusion en gélose peut aussi être utilisée, mais elle est moins sensible. Des témoins positifs et négatifs doivent être introduits dans toutes ces épreuves. Pour être considérés comme valides, les résultats de ces épreuves doivent être compris dans des limites prédéterminées. Pour déterminer la prévalence de la BD dans un troupeau, une région ou un pays, on peut ne faire qu'une prise de sang. En revanche, pour le diagnostic de la BD, des sérums prélevés en phase aiguë de la maladie ou lors de la convalescence sont les meilleurs pour confirmer une infection aiguë. Les sérums provenant du même animal doivent toujours être analysés côte à côte, sur la même plaque.

a) Test de séroneutralisation virale

Une souche cytopathogène de référence (la souche Moredun, par exemple) peut être engagée dans le test de VN, réalisée sur des cellules de lignées semi-continues telles que la lignée FLM. Les grandes lignes du protocole de cette épreuve sont décrites ci-dessous :

- i) Les sérums à tester et les sérums témoins sont inactivés par chauffage durant 30 min à 56 °C ;
- ii) À partir d'une dilution de départ au 1/4, les sérums à analyser subissent une dilution sériée de raison 2 dans le milieu de culture placé dans une plaque de micro-titrage pour culture cellulaire à fond plat de 96 puits. Selon la précision que l'on souhaite obtenir pour le test, 2 ou 4 puits sont utilisés pour chaque échantillon et pour chacune des dilutions. La gamme des dilutions peut aussi varier. Habituellement, on fait une première recherche d'anticorps sur des sérums dilués au 1/4 et on ne poursuit le titrage que sur ceux qui ont donné un résultat positif. Pour ce premier tri des sérums, il faut utiliser au moins 4 puits. Le volume de travail de base est de 25 µl : 25 µl du sérum dilué sont déposés dans chacun des puits ; 25 µl de milieu sont ajoutés à chacun des puits témoins situés en bas de la plaque de titrage et 25 µl de milieu contenant 100 DICT₅₀ (dose infectieuse 50 % pour la culture tissulaire) de virus sont ajoutés à chacun des puits situés en haut de cette plaque. Des sérums témoins positifs et négatifs doivent être prévus pour chaque épreuve, ainsi qu'un titrage du virus ;
- iii) Les plaques sont scellées avec un film ou un couvercle non toxiques, et incubées 1 h à 37 °C ;
- iv) 100 µl d'une suspension cellulaire contenant 2×10^5 cellules/ml sont ajoutés à chaque puits. Le sérum de fœtus de veau, ou le sérum équivalent utilisé pour favoriser la croissance cellulaire doit être exempt d'anticorps du BDV ;
- v) La plaque est à nouveau scellée ou incubée en chambre humide à 5 % de CO₂ durant 4 jours à 37 °C ;
- vi) L'effet cytopathogène (ECP) éventuel est recherché au microscope. Si on observe une dégénérescence cellulaire dans les puits témoins des sérums à analyser, elle sera due à la toxicité. On pourra alors tenter des dilutions plus poussées de ces sérums toxiques, mais il sera peut-être impossible d'obtenir des résultats fiables avec certains sérums. Le titre de neutralisation virale de chaque sérum est exprimé par la dernière dilution à laquelle le virus a été neutralisé dans 50 % des puits, qui peut-être calculée en utilisant la méthode statistique de Spearman-Kärber. Le sérum d'un animal dit séronégatif ne neutralisera pas le virus à sa dilution la plus faible, c'est-à-dire au 1/4.

Le choix du virus d'épreuve est difficile du fait de la diversité antigénique des pestivirus (8, 14). On peut utiliser des souches de référence de BDV cytopathogènes et de cellules bovines. Les résultats obtenus avec la souche Oregon C24V sont mieux corrélés à ceux obtenus avec la souche Moredun que ne le sont ceux obtenus avec la souche NADL. Il n'y a pas de souche idéale. C'est la souche locale qui donne le titre d'anticorps le plus élevé parmi des sérums d'ovins séropositifs qui doit être retenue. Le test de séroneutralisation virale peut aussi être réalisé avec des virus non-cytopathogènes, à condition de recourir, à partir de l'étape v) décrite ci-dessus, au système de coloration par l'immunopéroxydase décrit ci-après :

- i) Le milieu de culture est écarté et les puits sont lavés délicatement avec une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) tiède, puis séchés à l'air et refroidis à 4 °C ;
- ii) Les puits sont fixés en ajoutant rapidement dans chacun d'entre eux de l'acétone diluée à 95 % dans l'eau et préalablement refroidie à -20 °C. Les plaques sont maintenues 30 min à -20 °C, et on ne doit pas les laisser empilées ni les laisser se réchauffer, car cela pourrait entraîner une imprégnation du plastique ;
- iii) L'acétone est écartée et les plaques sont séchées rapidement dans une pièce froide ;
- iv) 50 µl de sérum anti BDV sont ajoutés à tous les puits, à une dilution prédéterminée dans du PBS additionné de 1 % de Tween 80 (PBST). Les plaques sont incubées 30 min à 37 °C en chambre humide ;
- v) Les plaques sont vidées et lavées 3 fois avec du PBST ;

- vi) Les puits sont vidés et un sérum anti-espèce approprié, conjugué à la peroxydase, y est ajouté à une dilution prédéterminée avant que les plaques soient remises 30 min à 37 °C en chambre humide ;
- vii) Les plaques sont vidées et lavées 3 fois avec du PBST ;
- viii) Les plaques sont bien vidées et on y rajoute 50 µl de substrat activé, par exemple du 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC). La solution mère d'AEC est composée de 0,1 g d'AEC dissous dans 15 ml de diméthyl formamide. Pour l'emploi, ajouter 0,3 ml de la solution mère à 4,7 ml de tampon acétate 0,05 M à pH 5,0 filtré sur membrane, puis ajouter 5 µl de H₂O₂ à 30 %.

NOTE : cette dernière solution est toxique et doit donc être manipulée avec précaution ;

- ix) Les plaques sont incubées à la température ambiante, et on recherche le développement éventuel d'une coloration rouge-brun caractéristique du cytoplasme cellulaire dans les puits témoins contenant du virus. Lorsque la coloration est achevée, le substrat est écarté délicatement et les puits sont bien lavés sous l'eau du robinet. Sans enlever cette eau des puits, les plaques sont examinées au microscope pour repérer ceux qui contiennent du virus ;
- x) Le titre de VN est calculé comme précédemment par la méthode de Spearman-Kärber.
- xi) Il est aussi possible de réaliser l'épreuve en colorant directement avec un conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine.

Il peut être parfois nécessaire de savoir si les anticorps trouvés dans un troupeau sont dirigés contre un virus appartenant à une sérogruppe particulier de *Pestivirus*. Dans ce cas, on peut recourir à une épreuve de VN différentielle dans laquelle les sérums seront titrés contre des virus représentant chacun des 4 groupes de *Pestivirus*, à savoir le BDV, les BVDV types 1 et 2, et le CSFV. C'est vis-à-vis du sérotype infectant que le titre du sérum sera le plus élevé, et on aura par la même occasion une idée des réactions croisées existantes avec les autres sérotypes.

b) Méthode immuno-enzymatique

Un ELISA de capture par anticorps monoclonaux (AcM) permettant de titrer les anticorps dirigés contre le BDV a été décrit. Deux AcMs panpestivirus détectant différents épitopes de la protéine immunodominante non structurale NS 2/3 sont utilisés pour capturer l'antigène, obtenu sur culture cellulaire puis lysé par un détergent. Les résultats qualitatifs de l'ELISA sont bien corrélés à ceux du test de VN (10).

L'antigène est préparé de la façon suivante : utiliser 8 flacons de 225 cm² couverts d'un tapis confluent de cellules FLM ; 4 d'entre eux seront infectés, et les 4 autres conservés comme témoins. Laver les flacons et en inoculer quatre à un taux d'infection de 0,01 à 0,1 (m.o.i. pour *multiplicity of infection*) de la souche cytopathogène de BDV Moredun. Laisser le virus s'adsorber durant 2 h à 37 °C. Ajouter le milieu d'entretien additionné de 2 % de FBS (exempt d'anticorps du BDV), et incubé les cultures 4 à 5 jours jusqu'à ce que l'effet pathogène soit évident. Réaliser un mélange d'une part des surnageants des 4 flacons témoins et d'autre part des surnageants des 4 flacons inoculés. Centrifuger à 3 000 *g* pendant 15 min pour mettre les cellules en culot. Ecarter les surnageants et conserver les culots cellulaires. Laver les flacons avec 50 ml de PBS et centrifuger comme dans l'étape précédente. Mélanger tous les culots de centrifugation dans 8 ml de PBS contenant 1 % de Nonidet P40 et reverser 2 ml de ce mélange dans chaque boîte témoin pour lyser les cellules encore attachées. Répéter l'opération pour les cellules infectées. Conserver les flacons à 4 °C, pendant au moins 2 h, en agitant vigoureusement toutes les 30 min la petite quantité de liquide qui baigne les cellules pour les détacher complètement. Centrifuger l'antigène infecté et l'antigène témoin à 12 000 *g* pendant 5 min et les conserver à -70 °C en petites aliquotes.

• Protocole

- i) Les deux anticorps sont dilués à un titre prédéterminé dans un tampon bicarbonate 0,05 M à pH 9,6. Tous les puits d'une plaque ELISA de qualité micro-titrage (par exemple Nunc maxisorb, Greiner 129b) sont sensibilisés pendant une nuit à 4 °C ;
- ii) Après avoir lavé 3 fois en PBST, une solution bloquante de PBST contenant 10 % de sérum de cheval (PBSTH) est ajoutée dans tous les puits, qui sont incubés 1 h à 37 °C ;
- iii) L'antigène est dilué à un titre prédéterminé dans du PBSTH en rangées alternées de puits, sensibilisés soit avec l'antigène viral soit avec l'antigène témoin, pendant 1 h à 37 °C. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois avec du PBST avant d'ajouter les sérums à titrer ;
- iv) Les sérums à titrer sont dilués à 1/50 en PBSTH et ajoutés à 2 puits sensibilisés avec le virus et à 2 autres puits sensibilisés avec l'antigène témoin, avec lesquels ils restent en contact pendant 1 h à 37 °C. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois avec du PBST ;

- v) Une IgG anti-ovin conjuguée à la peroxydase est diluée à un titre prédéterminé en PBSTH et ajoutée à tous les puits, avec lesquels elle reste en contact 1 h à 37 °C. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois avec du PBST.
- vi) Un substrat enzyme activé approprié, tel que de l'ortho-phénylène diamine (OPD) ou du bleu de tétraméthyl (TMB) est ajouté, en tenant bien compte des mises en garde du fabricant concernant la toxicité de ces produits. Après apparition de la coloration, la réaction est arrêtée par l'acide sulfurique et le résultat est lu sur un lecteur de plaques ELISA. La valeur moyenne d'absorption de 2 puits témoins est soustraite de celle de 2 puits contenant l'antigène viral de façon à obtenir la valeur d'absorption corrigée de chaque sérum. Les résultats sont exprimés en absorption corrigée par rapport à celle d'un sérum positif et d'un sérum négatif connus. Les titres ELISA peuvent également être extrapolés à partir de la courbe moyenne obtenue suite à une série de dilutions d'un sérum positif de référence connu.

Si des antigènes d'une puissance suffisante peuvent être obtenus, l'étape de capture par les AcMs peut être omise. Dans ce dernier cas, les rangées alternées de puits sont sensibilisées avec de l'antigène viral et de l'antigène témoin dilués à un titre prédéterminé dans du tampon au bicarbonate 0,05 M de pH 9,6, et abandonnées toute une nuit à 4 °C. Les plaques sont lavées et la réaction est arrêtée comme à l'étape ii) précédemment décrite. Après lavage, on ajoute les sérums dilués et l'épreuve se poursuit comme à partir de l'étape iv décrite ci-dessus.

c) Épreuve d'immunodiffusion en gélose

L'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) a été utilisée pour la première fois pour démontrer la relation existante sur le plan immunologique entre les virus de la BD, de la BVD et de la CSF.

La souche Oregon C24V de BVDV cultivée sur cellules testiculaires a été utilisée pour détecter les anticorps de la BD chez le mouton. Un bon antigène peut être préparé à partir du milieu surnageant d'une culture cellulaire où se manifeste un premier ECP. Le milieu doit être concentré environ 100 fois par dialyse contre du polyéthylène glycol (PEG). Une autre possibilité est d'ajouter 8 % (poids/volume) de PEG 6000 à une suspension virus/cellules soumise aux ultra-sons. Après agitation toute une nuit à 4 °C, le précipité est écarté par centrifugation 1 h à 1 800 *g*. Le surnageant est soigneusement décanté et le précipité est remis en suspension à 1 % dans de l'eau distillée jusqu'à atteindre le volume de la culture virus/cellules d'origine. Le précipité ainsi remis en suspension est centrifugé à 286 000 *g* pendant 2 h et le surnageant est soutiré pour servir d'antigène. Le précipité est écarté.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Pour être utile et éviter toute infection transplacentaire, un vaccin de la BD doit protéger les brebis avant leur entrée en période de reproduction. Des vaccins expérimentaux et commerciaux utilisant du BDV complet et inactivé ont été produits en Europe (5, 25).

Il a été démontré que les contaminants pestiviraux des vaccins modifiés à virus vivants pouvaient être à l'origine d'une maladie grave chez les porcs, les bovins, les ovins et les caprins auxquels ils avaient été administrés. Parmi les vaccins ainsi contaminés figurent ceux utilisés pour prévenir la maladie d'Aujeszky, la peste porcine classique, les rotaviroses, les coronaviroses, la peste bovine, la clavelée et l'ecthyma contagieux. La capacité insidieuse qu'ont les *Pestivirus* de traverser le placenta, et d'entraîner ainsi l'apparition d'individus IP, leur donne le pouvoir de contaminer les vaccins en infectant les cellules, le sérum ajouté aux milieux de culture ou les stocks de virus de semence. Du fait que presque tous les isolats de *Pestivirus* n'ont pas de pouvoir cytopathogène, ils restent ignorés à moins que des épreuves spécifiques soient mises en œuvre pour le détecter.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Un vaccin idéal doit contenir une ou des souches de virus capables de protéger contre tous les *Pestivirus* ovins. La démonstration a été faite récemment que 3 groupes de *Pestivirus* antigéniquement distincts infectent les ovins. L'un de ces groupes est représenté par la souche de référence du BDV Moredun ; le deuxième groupe comprend des virus similaires à la majorité des souches bovines de BVDV (BVDV type 1) ; et le troisième groupe comprend les souches les moins communes de BVDV (type 2) (32). Plus récemment, des isolats de pestivirus ovins ont été divisés sur la base d'analyses phylogénétiques et antigéniques en 3 génotypes : BDV-1, BDV-2 et BDV-3 (2). L'analyse phylogénétique suggère qu'un isolat italien de chèvre d'une part et les isolats de chamois et de moutons ibériques d'autre part représenteraient deux autres génotypes (28). Des expériences de neutralisation croisée sont nécessaires pour mieux

comprendre la signification de ces constatations. Quoiqu'il en soit, il semblerait que tout vaccin de la BD doit contenir au moins un représentant du groupe des BDV et un du groupe des BVDV (type1). La caractérisation de virus vaccins biologiquement clonés doit se faire par typage à l'aide d'anticorps monoclonaux, ou par génotypage (16).

b) Méthode de culture

Différentes cellules de ruminants peuvent être utilisées. La production optimale dépend du type de cellules et de l'isolat utilisé. Un vaccin commercial de la BD contenant 2 souches de virus a été préparé sur des cellules ovines de lignée continue (5). Les cellules doivent être produites à partir d'un lot de semence provenant lui-même d'un lot de semence primaire de cellules dans laquelle l'absence totale de micro-organismes contaminants a été démontrée. Un vaccin ne doit être produit que sur des cellules ayant subi moins de 20 passages à partir du MCS. Un contrôle des cellules doit être effectué à chacun de ces passages pour vérifier leur absence de contamination par les *Pestivirus*.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Tous les vaccins doivent satisfaire aux tests normalisés d'innocuité et d'efficacité. Le test d'innocuité des vaccins à BDV inactivés doit comprendre la recherche d'une contamination éventuelle de tous les ingrédients du vaccin par les *Pestivirus*.

Les tests d'efficacité des vaccins de la BD doivent démontrer la capacité qu'ont ces derniers de prévenir une diffusion du virus par voie transplacentaire. L'épreuve virulente de brebis gestantes vaccinées a été réalisée à 50-60 jours de gestation par inoculation intranasale de virus, ou en les mettant en contact avec des moutons IP (5).

2. Méthode de fabrication

Des vaccins à virus inactivés ont été fabriqués en employant des techniques de laboratoire conventionnelles sur cultures cellulaires stationnaires ou en flacons roulants. Les virus étaient inactivés par le formol ou la bêta-propiolactone. Les adjuvants étaient constitués par de l'hydroxyde d'aluminium ou de l'huile (5, 25).

3. Contrôles durant la fabrication

Les cultures doivent être examinées quotidiennement, pour s'assurer qu'elles sont indemnes de contamination bactérienne visible et que le seul ECP observé correspond à celui du virus en culture. Aucun ECP ne doit être observé dans les cultures utilisées pour propager des souches non-cytopathogènes de virus.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et de vérification de l'absence des contaminants pour les produits biologiques figurent au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

L'absence de virus viables doit être rigoureusement vérifiée dans les échantillons de vaccins à virus inactivés. Ces échantillons doivent être propagés plusieurs fois sur cellules sensibles pour s'assurer de l'absence de BDV vivant. À cet examen *in vitro*, le test d'innocuité normalisée peut ajouter l'injection à 2 moutons, sans anticorps contre le BDV, de 20 doses d'antigène brut. La présence de virus vivant parmi ces doses se traduira par une réponse sérologique plus importante que celle attendue après l'injection du seul virus inactivé. Les anticorps contre d'autres agents potentiellement contaminants peuvent aussi être recherchés dans les sérums de ces deux moutons.

c) Activité

L'activité du vaccin peut être également vérifiée sur des moutons séronégatifs, chez lesquels on surveille l'apparition et le titre des anticorps. Le titre infectieux du virus avant son inactivation mesure indirectement l'activité du vaccin. La teneur en antigène après inactivation du virus peut être mesurée en réalisant un ELISA de capture par les AcMs, corrélée ensuite aux résultats d'un test connu d'activité *in vivo*. Comme cela est recommandé pour mesurer l'activité des vaccins de la BVD chez les bovins, il faut démontrer que le vaccin peut prévenir la transmission transplacentaire du BDV chez les femelles gestantes.

d) Durée de l'immunité

On ne sait rien de la durée de l'immunité post-vaccinale. Il est peu probable que l'injection de vaccins à virus inactivés entraîne l'apparition d'un niveau d'immunité durable et des rappels annuels sont probablement nécessaires après 2 ou 3 injections de primo-vaccination. Il n'y a pas assez de résultats disponibles pour savoir si une corrélation existe entre le taux d'anticorps de la mère et la protection de son fœtus.

e) Stabilité

On sait peu de choses de la stabilité des vaccins de la BD. Les vaccins à virus inactivés devraient avoir une durée de conservation de 1 an au moins, à condition d'être protégés de la lumière et conservés à 4 °C.

f) Agents de conservation

Des agents de conservation peuvent être ajoutés dans les flacons de vaccins multidoses, si les autorités de contrôle en sont d'accord.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Le BDV n'est pas considéré comme présentant un risque pour la santé humaine. La manipulation du virus se fera en respectant les bonnes pratiques normalisées de microbiologie.

5. Contrôles sur le produit fini

a) Innocuité

Test *in vitro* uniquement.

b) Activité

Vérification de la valeur antigénique *in vitro*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BARLOW R.M. & PATTERSON D.S.P. (1982). Border disease of sheep: a virus-induced teratogenic disorder. *Adv. Vet. Med. (Suppl. J. Vet. Med.)*, **36**, 1–87.
2. BECHER P., AVALOS-RAMIREZ R., ORLICH M., CEDILLO ROSALES S., KONIG, M., SCHWEIZER M., STALDER H., SCHIRRMER H & THIEL H.-J. (2003). Genetic and antigenic characterisation of novel pestivirus genotypes; Implications for classification. *Virology*, **311**, 96–104.
3. BECHER P., ORLICH M. & THIEL H.-J. (1998). Complete genomic sequence of border disease virus a pestivirus from sheep. *J. Virol.*, **72**, 5165–5173.
4. BRAUN U., HILBE M., EHRENSPERGER F., SALIS F., ALTHERR P., STRASSER M., STALDER H.P. & PETERHANS E. (2002). Border Disease in einem Schafbetrieb. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **144**, 419–426.
5. BRUN A., LACOSTE F., REYNAUD G., KATO F. & SAINT-MARC B. (1993). Evaluation of the potency of an inactivated vaccine against border disease pestivirus infection in sheep. *In: Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses*, Edwards S., ed. Fondation Marcel Merieux, Annecy, France, 1–3 October 1992, 257–259
6. CARLSSON U. (1991). Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, **128**, 145–147.
7. CHAPPUIS G., BRUN A., KATO F., DAUVERGNE M., REYNAUD G. & DURET C. (1986). Etudes serologiques et immunologiques réalisées à la suite de l'isolement d'un pestivirus dans un foyer ovine chez des moutons de L'Aveyron. *In: Pestiviruses des Ovins et des Bovins*, Espinasse J. & Savey M. eds. Ste Francaise de Buiatrie, Paris, France, **55**, 66.
8. DEKKER A., WENSVOORT G. & TERPSTRA C. (1995). Six antigenic groups within the genus pestivirus as identified by cross-neutralisation assays. *Vet. Microbiol.*, **47**, 317–329.

9. ENTRICAN G., DAND A. & NETTLETON P.F. (1994). A double monoclonal-antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. *Vet. Microbiol.*, **43**, 65–74.
10. FENTON A., SINCLAIR J.A., ENTRICAN G., HERRING J.A. & NETTLETON P.F. (1991). A monoclonal antibody capture ELISA to detect antibody to border disease virus in sheep sera. *Vet. Microbiol.*, **28**, 327–333.
11. FULTON R.W., D'OFFAY J.M., SALIKI J.T., BURGE L.J., HELMAN R.G., CONFER A.W., BOLIN S.R. & RIDPATH J.F. (1999). Nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for typing ruminant pestiviruses: bovine viral diarrhoea viruses and border disease virus. *Can. J. Vet. Res.*, **63**, 276–281.
12. MCGOLDRICK A., BENSAUDE E., IBATA G., SHARP G. & PATON D.J. (1999). Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *J. Virol. Methods*, **79**, 85–95.
13. NETTLETON P.F., GILMOUR J.S., HERRING J.A. & SINCLAIR J.A. (1992). The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. *Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis.*, **15**, 179–188.
14. NETTLETON P.F., GILRAY J.A., RUSSO P. & DLISSI E. (1998). Border disease of sheep and goats. *Vet. Res.*, **29**, 327–340.
15. OGUZOGLU T.C., FLOEGEL-NIESMANN G., FREY H.R. & MOENNIG V. (2001). Differential diagnosis of classical swine fever and border disease: seroepidemiological investigation of a pestivirus infection on a mixed sheep and swine farm. *Dtsch Tierarztl. Wochenschr.*, **108**, 210–213.
16. PATON D.J., SANDS J.J., LOWINGS J.P., SMITH J.E., IBATA G. & EDWARDS S. (1995). A proposed division of the pestivirus genus into subgroups using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralization assays and genetic sequencing. *Vet. Res.*, **26**, 92–109.
17. RIDPATH J.F. & BOLIN S.R. (1997). Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. *Virus Res.*, **50**, 237–243.
18. SANDVIK T., PATON D.J. & LOWINGS P.J. (1997). Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of the 5' untranslated cDNA region. *J. Virol. Methods*, **64**, 43–56.
19. THABTI F., FRONZAROLI L., DLISSI E., GUIBERT J.M., HAMMAMI S., PEPIN M. & RUSSO P. (2002). Experimental model of border disease virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. *Vet. Res.*, **33**, 35–45.
20. THEIL H.-J., COLLETT M.S., GOULD E.A., HEINZ F.X., HOUGHTON M., MEYERS G., PURCELL R.H. & RICE C.M. (2005). Flaviviridae. In: *Virus Taxonomy*. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Elsevier Academic Press, 981–998.
21. THUR B., HILBE M., STRASSER M. & EHRENSPERGER F. (1997). Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 1371–1375.
22. VALDAZO-GONZALEZ B., ALVAREZ-MARTINEZ M. & SANDVIK T. (2007). Genetic and antigenic typing of border Disease virus isolates in sheep from the Iberian peninsula. *Vet. J.*, **174**, 316–324.
23. VAN RIJN P.A., VAN GENNIP H.G.P., LEENCLERSE C.H., BRUSCHKE C.J.M., PATON D.J., MOORMANN R.J.M. & VAN OIRSCHOT J.T. (1997). Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology*, **237**, 337–348.
24. VANTSIS J.T., BARLOW R.M., FRASER J. & MOULD D.L. (1976). Experiments in border disease VIII. Propagation and properties of a cytopathic virus. *J. Comp. Pathol.*, **86**, 111–120.
25. VANTSIS J.T., RENNIE J.C., GARDINER A.C., WELLS P.W., BARLOW R.M. & MARTIN W.B. (1980). Immunisation against Border disease. *J. Comp. Path.*, **90**, 349–354.
26. VILCEK S. (2001). Identification of pestiviruses contaminating cell lines and fetal calf sera. *Acta Virol.*, **45**, 81–86.

27. VILCEK S., HERRING A.J., HERRING J.A., NETTLETON P.F., LOWINGS J.P.L. & PATON D.J. (1994) Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.*, **136**, 309–323.
28. VILCEK S. & NETTLETON P.F. (2006). Pestiviruses in wild animals *Vet. Microbiol.*, **116**, 1–12.
29. VILCEK S., NETTLETON P.F., PATON D.J. & BELAK S. (1997). Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J. Gen. Virol.*, **78**, 725–735.
30. VILCEK S. & PATON D.J. (2000). A RT-PCR assay for the rapid recognition of border disease virus. *Vet. Res.*, **31**, 437–445.
31. WENSVOORT G. & TERPSTRA C. (1988). Bovine viral diarrhoea virus infection in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated virus. *Res. Vet. Sci.*, **45**, 143–148.
32. WENSVOORT G., TERPSTRA C. & DE KLUYVER E.P. (1989). Characterisation of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralisation. *Vet. Microbiol.*, **20**, 291–306.
33. WILLOUGHBY K., VALDAZO-GONZALEZ, B., MALEY M., GILRAY J. & NETTLETON P.F. (2006). Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses. *J. Virol. Methods*, **132**, 187–194.

*
* *

BRUCELLOSE OVINE ET CAPRINE (Infection à *Brucella ovis* exclue)

RÉSUMÉ

Brucella melitensis (biovar 1, 2 ou 3) est le principal agent de la brucellose ovine et caprine. Des cas sporadiques liés à *B. abortus* ont été rapportés, mais les cas d'infection naturelle sont rares chez les moutons et les chèvres. L'infection à *Brucella melitensis* est enzootique dans le Bassin méditerranéen, mais sa répartition est mondiale. L'Amérique du Nord (Mexico excepté), l'Europe du Nord et Central, l'Asie du Sud-Est, l'Australie et la Nouvelle-Zélande sont indemnes.

Cliniquement, la maladie se manifeste par l'un ou plusieurs des signes suivants : avortement, rétention placentaire, orchite, épididymite et, rarement, arthrite, avec excrétion de *Brucella* dans les sécrétions utérines et le lait. Le diagnostic de certitude repose sur l'isolement de *Brucella* à partir de prélèvements d'avortement, des sécrétions mammaires ou de prélèvements post mortem. Le diagnostic présomptif repose sur la mesure de l'immunité cellulaire ou humorale dirigée contre les antigènes de *Brucella*.

B. melitensis est fortement pathogène pour l'homme et est la cause d'une des plus redoutables zoonoses au monde ; tous les organes infectés, les cultures et tous les matériels potentiellement contaminés doivent être manipulés dans des conditions de confinement de niveau 3.

Identification de l'agent pathogène : la mise en évidence de bactéries acido-résistantes à la morphologie évocatrice dans des produits d'avortement ou des sécrétions vaginales constitue une présomption de brucellose, à fortiori si la sérologie est positive. Les techniques d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) récemment développées permettent également la détection de l'agent. Les *Brucella* spp. doivent être, si possible, recherchées par culture, sur des milieux sélectifs ou non, à partir des sécrétions utérines et mammaires, de l'avorton ou d'organes, comme les nœuds lymphatiques, la rate, l'utérus, les testicules et les épididymes. Espèce et biovar sont caractérisés sur la base du lysotype et de critères culturels, biochimiques et sérologiques. La PCR est devenue une méthode d'identification complémentaire basée sur des séquences spécifiques du génome.

Épreuves sérologiques et épreuve cutanée allergique : l'épreuve à l'antigène tamponné et la fixation du complément sont habituellement recommandées pour le dépistage des troupeaux ou des animaux infectés. La séro-agglutination lente n'est pas considérée comme fiable chez les petits ruminants. L'épreuve immuno-enzymatique indirecte (ELISA) peut aussi être utilisée pour le criblage des sérums. Pour les échantillons en mélange, il n'existe aucune épreuve efficace analogue à l'épreuve de l'anneau sur le lait des bovins. L'épreuve cutanée allergique à la brucelline peut être utilisée en dépistage ou comme épreuve de confirmation en troupeau non vacciné, pourvu qu'un allergène normalisé et exempt de lipopolysaccharide lisse (LPS-S) soit utilisé. Les résultats doivent être interprétés à la lumière des signes cliniques, des commémoratifs et des résultats des épreuves sérologiques ou bactériologiques mises en œuvre.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : la souche vaccinale Rev.1 de *Brucella melitensis* demeure le vaccin de référence pour l'immunisation des ovins et caprins contre la brucellose et auquel tout candidat vaccin doit être comparé. La production des antigènes de *Brucella* et du vaccin Rev.1 est basée sur un système de lot de semence. Les semences utilisées pour la fabrication des antigènes, des allergènes et des vaccins doivent provenir de centres de référence. Ils doivent répondre à des exigences minimales en

matière de viabilité, phase de dissociation, virulence résiduelle et immunogénicité, pureté, identité et innocuité, le cas échéant. Les préparations de Brucelline pour l'épreuve cutanée allergique doivent être exemptes de lipopolysaccharide lisse (LPS-S) et ne doivent induire aucune réaction inflammatoire non spécifique ou d'interférence avec les épreuves sérologiques. Les antigènes pour l'épreuve à l'antigène tamponné et la réaction de fixation du complément doivent être préparés à partir de cultures lisses de *B. abortus* souches 1119-3 ou 99 et répondre à des exigences minimales en matière de pureté, sensibilité et spécificité. Les antigènes pour l'ELISA indirect et les épreuves de précipitation en gélose sont préparés à partir du biovar 1 de la souche de référence 16M de *B. melitensis*.

A. INTRODUCTION

La brucellose ovine et caprine (infection à *Brucella ovis* exclue) est le plus souvent due à l'un des 3 biovars de *B. melitensis*. Des cas sporadiques d'infection à *B. abortus* ou *B. suis* ont été rapportés chez les ovins-caprins, mais de tels cas sont rares. Aux plans pathogénique et épidémiologique, l'infection à *B. melitensis* des petits ruminants est très similaire à l'infection bovine à *B. abortus* (voir Chapitre 2.4.3., « Brucellose bovine »). Le plus souvent, la source d'infection est le placenta et les sécrétions vaginales et fœtales rejetées par les brebis et chèvres lors de l'avortement ou de la parturition à terme. L'excrétion de *Brucella* est également fréquente dans les sécrétions mammaires et dans le sperme, et les *Brucella* peuvent être isolées de prélèvements divers, comme les nœuds lymphatiques de la tête, la rate et les organes de l'appareil reproducteur (utérus, épидидymes et testicules) ou bien de lésions d'arthrite (2).

L'infection à *B. melitensis* chez les autres animaux domestiques et sauvages sensibles (voir Chapitre 2.4.3.) n'est pas rare quand ces espèces sont élevées en contact étroit avec des moutons et des chèvres dans les zones d'enzootie. Les manifestations de la brucellose dans ces espèces sont similaires à celles observées chez les bovins et les petits ruminants.

Le Manuel de sécurité biologique en laboratoire de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) classe les *Brucella* (et particulièrement *B. melitensis*) dans le groupe de risque III. La brucellose est aisément contractée par l'homme, chez qui elle cause un syndrome fébrile aigu – la fièvre ondulante – qui peut évoluer vers une forme plus chronique et également induire de sérieuses complications articulaires, cardiovasculaires ou neurologiques. L'infection est souvent liée à une exposition professionnelle et est plus particulièrement contractée par les voies orale, conjonctivale ou respiratoire. L'ingestion de produits laitiers constitue, quant à elle, le risque majeur pour la population générale. Le risque est important pour les vétérinaires, les personnels d'abattoir et les éleveurs qui manipulent les animaux infectés et les avortons ou placentas. La brucellose est l'une des infections acquises au laboratoire les plus fréquentes. Aussi, des règles strictes de sécurité doivent-elles être respectées pour la manipulation des cultures et des prélèvements fortement infectés, tels que les produits d'avortement. Des recommandations spécifiques ont été établies concernant les précautions de sécurité à respecter en présence de produits contaminés par *Brucella* (pour de plus amples détails voir Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries » et les refs. 2, 42, 95 et 96 du Chapitre 2.4.3.). La manipulation au laboratoire de cultures vivantes ou de produits provenant d'animaux infectés est dangereuse notamment parce que de gros volumes sont manipulés, et doit être effectuée à un niveau de confinement de niveau 3 ou plus, comme souligné au Chapitre 1.1.2., pour réduire l'exposition professionnelle.

Des arguments génétiques et immunologiques indiquent que toutes les espèces et biovars du genre *Brucella* sont très proches et il a été proposé (mais pas encore accepté par le Sous-comité de Taxonomie) que le genre soit assimilé à une seule espèce, les espèces classiques (*abortus*, *melitensis*, etc.) étant considérées comme des biovars (pour plus d'information voir réf. 53 du Chapitre 2.4.3.). Néanmoins, en 2005 sur la base de différences significatives dans les préférences d'hôte et l'épidémiologie entre les différentes espèces de *Brucella*, ainsi que sur une réelle diversité génomique, le Sous-comité de taxonomie des *Brucella* du Comité international de systématique des procaryotes a pris la décision de revenir à la taxonomie d'avant 1986 ; cette décision implique donc l'acceptation de nouveau des 6 dénominations d'espèce (*nomenspecies*) de *Brucella* avec des biovars reconnus. Les noms classiquement assignés aux 6 espèces de *Brucella* sont ceux publiés en 1980 dans la *Liste approuvée des noms de bactéries*, et les souches-types sont mentionnées avec les noms : *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* et *B. canis* (<http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm>). Les 3 premières sont subdivisées en biovars sur la base de caractères culturels et sérologiques (voir Tableaux 1 et 2 à la fin du Chapitre 2.4.3.). La classification, les propriétés microbiologiques et sérologiques du genre *Brucella*, des espèces apparentées et des biovars sont décrites dans le Chapitre 2.4.3.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Pour les techniques détaillées d'identification des *Brucella*, veuillez vous reporter au Chapitre 2.4.3.

2. Épreuves sérologiques

Lorsque la bactériologie ne peut être mise en œuvre, le diagnostic de l'infection brucellique peut reposer sur la sérologie (2, 18). En routine, les anticorps anti-*Brucella* sont recherchés dans le sérum sanguin. Les épreuves sérologiques les plus largement utilisées pour le diagnostic des infections à *Brucella* lisses chez les ovins et les caprins sont les épreuves utilisant un antigène tamponné de *Brucella* (*Buffered Brucella Antigen Tests* ou BBATs), c'est-à-dire le test à l'antigène tamponné (EAT) et le Card-test, qui sont sensiblement identiques et la réaction de fixation du complément (FC). L'épreuve de l'anneau (ou ring-test) sur lait de mélange, très utile chez les bovins, n'est pas utilisable chez les petits ruminants.

Chez les petits ruminants, l'EAT et la FC sont les méthodes les plus largement utilisées (17) et constituent les seules épreuves prescrites pour les échanges internationaux. L'EAT n'a pas une spécificité absolue, mais est adapté au dépistage de masse des troupeaux infectés ou pour garantir l'absence d'infection dans les troupeaux indemnes. Cependant, du fait du relatif manque de sensibilité des deux épreuves, des discordances de résultats entre EAT et FC sont fréquentes chez les ovins et caprins infectés (6). Aussi, de manière à augmenter la probabilité de détection des animaux infectés et d'améliorer le contrôle de l'infection par assainissement dans les zones en cours d'éradication, les résultats des deux épreuves doivent-ils être interprétés en parallèle (1, 4, 6). Lorsque, pour des raisons pratiques, il est impossible de mettre en œuvre la FC en même temps que l'EAT dans le cadre des programmes d'éradication, il est recommandé d'augmenter la sensibilité de l'EAT en utilisant 75 µl de sérum et 25 µl d'antigène à la place d'un volume égal de chaque. Cette simple modification augmente la sensibilité de l'EAT et réduit la fréquence des discordances de résultats entre EAT et FC (6). Par ailleurs, comme il est impossible de différencier les anticorps induits par le vaccin Rev.1 de ceux induits par une infection naturelle, le contexte vaccinal du troupeau doit être pris en considération lors de l'interprétation des résultats sérologiques. De plus, ces deux épreuves ne sont pas suffisamment spécifiques pour permettre de différencier des réactions sérologiques dues à *B. melitensis*, de réactions sérologiques faussement positives (RSFP) liées à des bactéries croisant au plan antigénique telles que *Yersinia enterocolitica* O:9.

De bons résultats ont été obtenus en matière de diagnostic chez les ovins et caprins avec les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) indirects ou de compétition, en utilisant divers antigènes, les plus fiables étant celles utilisant des antigènes à forte concentration en lipopolysaccharide lisse (LPS-S). L'ELISA de compétition (c-ELISA) présente une sensibilité analogue et l'ELISA indirect (i-ELISA) une sensibilité supérieure à celle de l'EAT et de la FC, mais comme les épreuves classiques, les ELISA sont incapables de différencier les animaux infectés de ceux récemment vaccinés au Rev.1 (19) ou des animaux infectés par des bactéries croisant au plan antigénique. Cependant, des études préliminaires ont été menées sur un c-ELISA capable de différencier entre les anticorps dus à la vaccination et ceux dus à une infection. Des c-ELISA et i-ELISA à base d'une protéine périplasmique hautement immunogène de *B. abortus* (20) et *B. melitensis* (11) ont été utilisés pour le diagnostic de la brucellose chez les moutons ; ils apparaissent prometteur pour la différenciation des animaux infectés de ceux vaccinés au Rev.1 (10, 13). Certains de ces ELISA ont des avantages potentiels en sensibilité et spécificité par rapport à l'EAT et à la FC, mais un important travail est encore nécessaire pour la normalisation des réactifs (15).

- **Sérums étalons de référence**

Le sérum étalon (de référence) primaire pour la normalisation de l'EAT et de la FC chez les ovins et les caprins est le sérum international « *OIE International Standard Serum* » (OIEISS ; Voir le Chapitre 2.4.3).

- **Production des antigènes**

Veuillez vous reporter au Chapitre 2.4.3. Les souches 99 ou 1119 de *Brucella abortus* biovar 1 sont les seules souches recommandées pour la préparation des antigènes d'EAT et de FC chez les petits ruminants.

- a) **Épreuves à l'antigène tamponné de *Brucella* (épreuves prescrites pour les échanges internationaux)**

Veuillez vous reporter au Chapitre 2.4.3.

- **Production de l'antigène**

Veillez vous reporter au Chapitre 2.4.3. On notera que l'antigène Rose Bengale (RB) préparé à partir de *B. abortus* est classiquement utilisé pour la recherche de *B. melitensis*. La normalisation de l'antigène RB telle qu'elle décrite au Chapitre 2.4.3 assure une sensibilité suffisante pour les épreuves à l'antigène tamponné à des fins de commerce international. En outre, elle donne une spécificité adéquate dans les régions indemnes dans lesquelles de fausses réactions positives sont observées du fait de réactions croisées avec d'autres bactéries telles que *Yersinia enterocolitica* O:9. Cependant, cette normalisation est probablement la principale cause de la baisse de sensibilité de certains lots d'antigène RB et des discordances avec la FC (6). Par conséquent, quand des épreuves à l'antigène tamponné sont utilisées dans des programmes d'éradication en zone d'enzootie, il est recommandé d'ajuster le titre de l'antigène RB de façon qu'il soit positif à la dilution 1/45 de l'OIEISS et négatif à la dilution 1/55, sans que cela n'affecte la spécificité du test. Les discordances avec la FC peuvent aussi être réduites en utilisant 75 µl de sérum et 25 µl d'antigène au lieu de volumes égaux pour chacun comme cela est mentionné dans le protocole de l'épreuve.

- **Protocole**

Veillez vous reporter au Chapitre 2.4.3.

b) Test de fixation du complément (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

- **Production de l'antigène**

Veillez vous reporter au Chapitre 2.4.3. On notera que l'antigène FC préparé à partir de *B. abortus* est classiquement utilisé pour la recherche de *B. melitensis*.

- **Protocole**

Veillez vous reporter au Chapitre 2.4.3.

c) Épreuves immuno-enzymatiques

Divers i-ELISA ont été décrits avec différentes préparations antigéniques, différents conjugués antiglobuline-enzyme et différents substrats/chromogènes. Plusieurs i-ELISA sont commercialisés mais, à l'heure actuelle, il n'existe pas de protocoles internationalement reconnus pour la normalisation de ces tests pour utilisation comme épreuves de diagnostic de la brucellose chez les petits ruminants en vue des échanges internationaux.

La méthode classique est décrite au Chapitre 2.4.3.

3. Autres épreuves

a) Épreuve de polarisation de la fluorescence (épreuve de substitution pour les échanges internationaux)

Le test de polarisation de la fluorescence (TPF) est une technique simple qui permet de mesurer l'interaction antigène-anticorps et peut être réalisée au laboratoire ou sur le terrain. Au cours du test les réactifs ne sont pas séparés ce qui rend son exécution très rapide.

Le mécanisme qui sert de base à cette épreuve est la rotation aléatoire des molécules en solution. La taille des molécules est le principal facteur qui influence le taux de rotation qui est inversement proportionnel à la taille des molécules. Une petite molécule tourne plus rapidement qu'une molécule plus grande. Si une molécule est marquée avec un fluorochrome, le temps de rotation d'un angle de 68,5° peut être déterminé en mesurant l'intensité de la lumière polarisée sur les plans vertical et horizontal. Une grande molécule émet plus de lumière dans un seul plan (elle est plus polarisée) qu'une petite molécule qui tournera plus vite en émettant plus de lumière non polarisée.

Pour la plupart des TPF, un antigène de faible poids moléculaire – moins de 50 kDa – est marqué avec un fluorochrome et ajouté au sérum ou tout autre fluide à analyser. Si des anticorps sont présents, la fixation sur l'antigène marqué entraînera une baisse de son taux de rotation et cette baisse peut être mesurée.

Pour le diagnostic de la brucellose, un fragment de faible poids moléculaire (en moyenne 22 kDa) du polysaccharide-O (OPS) du LPS-S de *B. abortus* est marqué avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF) et utilisé comme antigène. Cet antigène est ajouté au sérum dilué ou au sang total et une mesure du taux d'anticorps est obtenue en environ 2 min en utilisant un analyseur de polarisation de la fluorescence.

Le protocole du TPF pour le diagnostic de *Brucella* est décrit en détail au Chapitre 2.4.3.

b) Épreuve cutanée allergique à la brucelline (épreuve de substitution pour les échanges internationaux)

L'épreuve cutanée allergique à la brucelline est une épreuve immunologique de substitution, utilisable pour le dépistage des troupeaux non vaccinés, pourvu qu'un allergène purifié (sans trace de LPS-S) et normalisé (tel que la Brucelline-INRA) soit utilisé.

L'épreuve cutanée allergique (ECA) à la brucelline dispose d'une sensibilité élevée pour le diagnostic de l'infection à *B. melitensis* chez les petits ruminants et, en l'absence de vaccination, est considérée comme l'une des épreuves de diagnostic les plus spécifiques (2, 4, 15, 17). Ceci est particulièrement intéressant pour l'interprétation des RSFP dues à l'infection par des bactéries croisant au plan antigénique (les animaux à RSFP sont toujours négatifs à l'ECA), notamment en zone indemne de brucellose.

Cependant, malgré cette forte sensibilité, certains animaux infectés ne présentent pas de réaction positive et, de plus, les animaux vaccinés au Rev.1 peuvent présenter une réaction à cette épreuve pendant des années (15). Ceci conduit à ne pas recommander cette épreuve comme épreuve unique de diagnostic ou pour le contrôle lors des échanges internationaux.

Pour obtenir des résultats fiables, il est impératif d'utiliser une préparation de brucelline normalisée, ne contenant pas de LPS-S. Autrement, elle pourrait induire des réactions inflammatoires non spécifiques ou interférer avec les épreuves sérologiques mises en œuvre par la suite. La Brucelline-INRA qui est préparée à partir d'une souche rugueuse de *B. melitensis* répond à ces exigences et une préparation commerciale équivalente est disponible¹.

- **Protocole**

- 0,1 ml de brucelline est injecté en intradermique dans la paupière inférieure.
- La lecture est effectuée après 48 h.
- Toute réaction visible ou palpable d'hypersensibilité, telle qu'une réaction œdémateuse entraînant une élévation de la peau ou un épaississement de la paupière (≥ 2 mm) doit être interprétée comme une réaction positive.

Bien que l'épreuve cutanée allergique à la brucelline soit l'une des épreuves les plus spécifiques en brucellose (chez les animaux non-vaccinés), le diagnostic ne devra pas se limiter à l'observation de réactions positives, mais prendre également en compte les résultats des épreuves sérologiques. L'inoculation intradermique de brucelline peut induire une anergie temporaire (baisse de la réponse cellulaire). Aussi est-il généralement recommandé de laisser un intervalle de 6 semaines entre deux épreuves sur le même animal.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

C1. Brucelline

Veuillez vous reporter au Chapitre 2.4.3.

C2. Vaccins

Vaccin *Brucella melitensis* Rev.1

Le vaccin *Brucella melitensis* Rev.1 est le vaccin le plus largement utilisé pour la prévention de la brucellose chez les ovins-caprins et demeure le vaccin de référence auquel tout autre vaccin doit être comparé. Le vaccin Rev.1 est utilisé sous forme d'une suspension lyophilisée de la souche Rev.1 vivante de *B. melitensis* biovar 1 pour l'immunisation des ovins et des caprins. Il est habituellement délivré aux agneaux et chevreaux âgés de 3 à 6 mois en une seule injection par voie sous-cutanée ou conjonctivale. La dose recommandée se situe entre $0,5 \times 10^9$ et $2,0 \times 10^9$ organismes viables. La vaccination par voie sous-cutanée induit de fortes interférences

¹ Brucellergène OCB®, Synbiotics Europe, 2 rue Alexander Fleming, 69007 Lyon, France.

avec les épreuves sérologiques et ne doit pas être recommandée dans les programmes combinés d'éradication (14, 19). Cependant, lorsque ce vaccin est administré par voie conjonctivale aux agneaux et chevreaux âgés de 3 à 6 mois, il induit une protection semblable sans réponse anticorps persistante, ce qui facilite l'application de programmes d'éradication associés avec la vaccination (14, 19). Des précautions doivent être prises lors de l'utilisation du Rev.1 pour éviter de contaminer l'environnement ou d'infecter l'homme. Dans de nombreux pays en développement et en zones d'enzootie, la vaccination de la population entière est considérée comme la meilleure option pour contrôler la maladie (5). Cependant, on sait que le vaccin Rev.1 peut induire des avortements et une excrétion dans le lait lorsque les animaux sont vaccinés pendant la gestation, que ce soit à dose normale ou réduite (5). Ces effets secondaires sont considérablement réduits lorsque les animaux adultes sont vaccinés par voie conjonctivale (à dose normale), avant le rut ou durant le dernier mois de gestation. Ainsi, lorsque la vaccination de masse constitue le seul moyen de contrôler la maladie, la campagne de vaccination doit être organisée avec la dose normale de Rev.1 administrée par voie conjonctivale et au moment où les animaux sont non gestants ou durant la saison d'agnelage (5).

La vaccination en sous-cutanée des jeunes animaux et la vaccination des animaux adultes, même à des doses réduites, peut entraîner une persistance sur le long terme d'anticorps induits par le vaccin dans une proportion significative d'animaux vaccinés. Ce phénomène peut être à l'origine de sérieuses interférences lors du diagnostic sérologique de la brucellose. Comme indiqué ci-dessus, la vaccination conjonctivale minimise ces problèmes et est, de ce fait, recommandée pour les programmes mixtes d'éradication. Aussi, le diagnostic sérologique de la brucellose doit-il prendre en compte l'état vaccinal du troupeau et la fréquence de la distribution générale du titre des anticorps détectés dans le groupe des animaux testés.

1. Gestion de la semence bactérienne

a) Caractéristiques de la semence bactérienne

La semence originale de la souche Rev.1 de *Brucella melitensis* biovar 1 peut être obtenue commercialement pour la production de vaccin². Une souche Rev.1 de référence européenne qui possède les caractéristiques de la souche Rev.1 originale a été produite récemment par la Pharmacopée Européenne³.

La production des vaccins anti-*Brucella* vivants est basée sur le système de lot de semence décrit plus haut (Section B.2) pour les antigènes de l'EAT et de la FC. Les souches doivent être cultivées sur un milieu approprié. Les propriétés de la souche Rev.1 doivent correspondre à celles d'une culture pure d'une souche de *B. melitensis* biovar 1 mais sa croissance doit être plus lente. De plus, en atmosphère normale (une atmosphère renfermant du CO₂ modifie les résultats) à 37 °C, elle doit pousser sur un milieu renfermant de la streptomycine (2,5 µg/ml), et doit être inhibée par l'addition à un milieu de culture approprié de benzylpénicilline sodique (3 µg [5 Unités Internationales (UI)]/ml), de thionine (20 µg/ml) ou de fuchsine basique (20 µg/ml). Une technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) et des techniques moléculaires ont été récemment mises au point qui permettent l'identification de la souche vaccinale (3, 12). La souche doit également présenter les mêmes caractéristiques de virulence résiduelles et d'immunogénicité chez les souris que la semence originale.

b) Méthode de culture

La gélose sérum-dextrose ou trypticase-soja sont des milieux qui conviennent pour la propagation de la souche Rev.1 (2, 21), qui ne pousse pas bien sur gélose pomme de terre.

Pour la production de vaccin, la souche Rev.1 peut être cultivée dans des conditions analogues à celles décrites pour les souches 99 et 1119-3 (cf. Chapitre 2.4.3). Cependant, la souche Rev.1 nécessite généralement 3 à 5 jours pour obtenir une croissance adéquate, le soluté salin phénolé est remplacé par un stabilisateur de lyophilisation et les cellules ne sont pas inactivées mais conservées à 4 °C. Les contrôles de qualité sont mis en œuvre comme décrit plus haut. De plus, les exigences spécifiques pour la production de vaccin Rev.1 sont les suivantes : chaque lot de semence (c'est-à-dire la culture utilisée pour ensemercer le milieu de production vaccinale) ne doit pas correspondre à plus de 3 passages depuis la semence originale et la culture récoltée pour un lot de vaccin ne doit pas avoir subi plus de 3 passages depuis le lot de semence ou la semence originale. L'absence de dissociation doit toujours être vérifiée sur la semence originale avant son utilisation. La méthode recommandée pour la préparation du lot de semence est donnée à la référence 2. Le stabilisateur de lyophilisation suivant (stérilisé par filtration) a été validé : hydrolysate de caséine (2,5 g), sucrose (5 g) et glutamate de sodium (1 g), dissous en eau distillée (100 ml).

2 Disponible auprès de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, 37380 Nouzilly, France.

3 Disponible auprès de la Pharmacopée Européenne, BP 907, 67029 Strasbourg Cedex 1, France.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

De nombreuses études indépendantes ont démontré la valeur de la souche Rev.1 de *B. melitensis* dans la prévention vaccinale de la brucellose chez les ovins et les caprins. Sa virulence reste inchangée après passage sur des brebis ou chèvres gestantes. Des avortements peuvent être induits par le vaccin lorsqu'il est inoculé à des brebis ou chèvres gestantes. Ces avortements induits par le vaccin ne sont pas évités lorsqu'on utilise une dose réduite et on a démontré que des doses aussi faibles que 10^6 sont capables de provoquer des avortements et une excrétion de la souche dans le lait, qu'elles soient inoculées par voie sous-cutanée ou conjonctivale (5).

Un vaccin Rev.1 est efficace s'il possède les caractéristiques de la souche Rev.1 originale, c'est-à-dire celles de la souche 16M (ATCC No. 23456) du biovar 1 de *B. melitensis*, à l'exception de celles spécifiques de la souche Rev.1 (2, 17) et s'il est satisfaisant en termes de virulence résiduelle et d'immunogénicité dans le modèle murin (8) (voir ci-dessous).

2. Méthode de fabrication (2, 21)

Pour la production de la souche vaccinale Rev.1 de *B. melitensis*, les procédures décrites plus haut pour les antigènes (2) sont applicables, mais, dans ces cas, les cellules sont collectées en stabilisateur de lyophilisation et concentrées par centrifugation. La récolte obtenue à partir d'un cycle de fermenteur ou d'un lot de boîtes de Roux inoculées simultanément constitue une production unique. Plusieurs productions uniques peuvent être mélangées pour former un vrac final, utilisé pour remplir les conteneurs finaux d'un lot de vaccin. Avant d'opérer le mélange, chaque production unique doit être vérifiée en matière de pureté, de concentration cellulaire, de dissociation et d'identité. Le volume du vrac final est ajusté par addition de la quantité suffisante de stabilisateur permettant d'obtenir la concentration appropriée d'organismes viables. Après ajustement de la concentration cellulaire du vrac final, on effectue les tests d'identité, de dissociation de phase et d'absence de contaminants (voir ci-dessous).

3. Contrôle en cours de fabrication

Les contrôles en cours de fabrication doivent être effectués sur les cultures de vaccin Rev.1, sur milieu solide ou liquide, de manière à vérifier l'identité de la souche, sa pureté et l'absence de dissociation en formes rugueuses pendant la préparation des lots de semence, des productions uniques, des vracs finaux et des lots (de répartition) finaux. Au moins 99 % des cellules de lot de semence et au moins 95 % des cellules de lot final doivent être en phase lisse.

La concentration cellulaire doit être estimée sur les vracs et déterminée précisément sur chaque lot final. L'immunogénicité et la virulence résiduelle (temps de persistance 50 %) doivent aussi être déterminées sur le lot de semence et le lot final.

4. Contrôle des lots

Avec un vaccin lyophilisé, les épreuves de contrôles doivent être conduites sur le vaccin reconstitué dans l'état où il sera utilisé.

a) Stérilité (ou absence de microorganismes contaminants)

Le vaccin Rev.1 doit être contrôlé quant à la présence de contaminations bactériennes ou fongiques selon les prescriptions du Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Le vaccin Rev.1 est un produit virulent en soi et il doit conserver un certain niveau de virulence pour être efficace (voir Section C2.4.c. au Chapitre 2.4.3.).

c) Activité

Un vaccin Rev.1 est actif s'il possède les caractéristiques de la souche originale de Rev.1., c'est-à-dire s'il conserve l'identité, le caractère lisse, l'immunogénicité et la virulence résiduelle (9). Les lots doivent également être vérifiés pour le nombre de bactéries viables.

- **Identité**

Le vaccin Rev.1 reconstitué ne doit pas contenir de contaminants exogènes. Les *Brucella melitensis* présentes dans le vaccin sont identifiées au moyen des tests morphologiques, sérologiques et

biochimiques et par culture : en culture à 37 °C en air, la souche Rev.1 est inhibée par l'addition au milieu de culture ad hoc de 3 µg (5 UI) par ml de benzylpénicilline sodique, de thionine (20 µg/ml) ou de fuchsine basique (20 µg/ml) ; la souche pousse en gélose contenant 2,5 µg par ml de streptomycine.

- **Dissociation de phase (caractère lisse)**

Veuillez vous reporter au Chapitre 2.4.3.

De légères différences de taille, difficiles à observer, peuvent parfois apparaître avec les colonies de Rev.1. Les petites colonies (de 1 à 1,2 mm de diamètre) sont typiques de Rev.1, mais des colonies plus grosses peuvent apparaître selon le milieu utilisé, le taux d'humidité de l'atmosphère de l'étuve et la présence ou l'absence de CO₂. La fréquence de variation de la taille des colonies est habituellement de 1 grosse colonie pour 10³ petites colonies. Les deux variants de Rev.1 sont du type S (lisse). Pour éviter d'accroître cette variation de taille au fur et à mesure des passages, il est important de toujours sélectionner des petites colonies pour la préparation des lots de semence.

- **Dénombrement des bactéries viables**

Veuillez vous reporter au Chapitre 2.4.3.

- **Virulence résiduelle (Temps de persistance ou de guérison 50 %) (7, 16)**

Les mêmes procédures techniques que celles appliquées au vaccin *B. abortus* B19 (voir Chapitre 2.3.1.) pour le calcul du temps de persistance ou de guérison 50 % (TP₅₀) s'appliquent au vaccin Rev.1, mais le lot de semence de B19 ou le lot à tester (vaccin contrôlé) et la semence originale de *B. abortus* B19 (utilisée comme souche de référence) sont remplacés, respectivement, par le lot de semence de *B. melitensis* Rev.1 ou le lot à tester (vaccin contrôlé) et la semence originale de *B. melitensis* Rev.1 comme souche de référence. Le TP₅₀ et ses limites de confiance pour la souche de référence originale de Rev.1 se situent à environ 7,9 ± 1,2 semaines. Un lot de semence ou un lot final de vaccin Rev.1 donné doit conserver une virulence résiduelle semblable pour être acceptable.

Si cette épreuve a été mise en œuvre avec de bons résultats sur un lot représentatif du vaccin, alors elle n'a pas à être répétée en routine sur les lots de vaccin préparés à partir du même lot de semence et selon le même procédé de fabrication.

- **Immunogénicité en modèle souris**

Les mêmes procédures techniques que celles appliquées au vaccin *B. abortus* B19 (voir Chapitre 2.4.3.) pour le calcul de l'immunogénicité s'appliquent au vaccin Rev.1, mais le lot de semence de B19 ou le lot à tester (vaccin contrôlé) et la semence originale de *B. abortus* B19 (utilisée comme souche de référence) sont remplacées, respectivement, par le lot de semence de *B. melitensis* Rev.1 ou le lot à tester (vaccin contrôlé) et la semence originale de *B. melitensis* Rev.1 comme souche de référence.

Les conditions de l'expérience de contrôle sont valides si : a) la réponse des souris non vaccinées (moyenne des Y) est d'au moins 4,5 ; b) la réponse des souris vaccinées avec le vaccin Rev.1 de référence est inférieure à 2,5 ; et c) l'écart type calculé sur chaque lot de 6 souris est inférieur à 0,8.

Si cette épreuve a été mise en œuvre avec de bons résultats sur un lot représentatif du vaccin, alors elle n'a pas à être répétée en routine sur les lots de vaccin préparés à partir du même lot de semence et selon le même procédé de fabrication.

d) Durée de l'immunité

Il est admis que la vaccination par une dose recommandée de vaccin Rev.1, par voie sous-cutanée ou conjonctivale, confère une immunité solide et durable aux ovins et aux caprins. Cependant, l'expérience accumulée sur le terrain montre que cette immunité décline avec le temps et qu'il est raisonnable d'envisager une revaccination dans les zones d'enzootie.

L'utilisation d'une dose réduite produit une immunité moins efficace, alors que les effets secondaires, telles que la production d'anticorps ou l'induction d'avortements ne sont pas totalement évités.

e) Stabilité

Les caractéristiques de la souche vaccinale Rev.1 préparée à partir d'un stock de semence d'origine appropriée sont stables, pour autant que les exigences des contrôles en cours de fabrication et des contrôles de lot décrits plus haut soient satisfaites et que la souche ne montre aucune tendance à la réversion vers la virulence. Le vaccin lyophilisé montre une baisse progressive de viabilité mais doit conserver son niveau d'activité pour la durée de validité recommandée. On peut limiter ce phénomène en s'assurant que la concentration immédiatement après la lyophilisation est en léger excès par rapport à

l'exigence minimale. Le maintien de la chaîne du froid au cours de la distribution du vaccin doit en principe assurer sa viabilité.

f) Agents de conservation

On ne doit utiliser aucun agent de conservation antimicrobien dans le vaccin vivant Rev.1. Pour la préparation du vaccin lyophilisé, un produit stabilisant tel que celui décrit en Section C2.4.f. du Chapitre 2.4.3. est recommandé.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

La souche Rev.1 de *Brucella melitensis*, bien qu'atténuée, demeure capable de causer une maladie chez l'homme. Aussi, les cultures et les suspensions bactériennes doivent-elles être manipulées en conditions appropriées de biosécurité (voir le Chapitre 1.1.2.). La reconstitution du vaccin et les manipulations ultérieures doivent être effectuées avec précaution de manière à éviter les contaminations accidentelles de l'œil ou de la peau. Le vaccin restant et le matériel d'injection doivent être décontaminés au moyen d'un désinfectant approprié (dérivé phénolé, iodé ou aldéhyde) à la concentration recommandée. Une consultation médicale doit être envisagée en cas d'exposition accidentelle. L'efficacité du traitement antibiotique des infections dues à Rev.1 chez l'homme n'a pas été formellement établie. En cas de contamination par le Rev.1, un traitement associant doxycycline et rifampicine est recommandé.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir Section C2.4.b du Chapitre 2.4.3.

b) Activité

L'activité du vaccin lyophilisé doit être déterminée sur le produit final. Les tests sont décrits en Section C2.4.c du Chapitre 2.4.3.).

Afin d'évaluer l'efficacité d'un vaccin, un échantillon représentatif d'animaux qui étaient auparavant négatifs sont vaccinés avec chacun des nouveaux lots de vaccin et sont saignés 15 à 20 jours après la vaccination ; les sérums sont testés avec l'EAT. Plus de 80 % des animaux doivent se révéler positifs à l'EAT quelque soit la voie d'inoculation utilisée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALTON G.G. (1990). *Brucella melitensis*. In: Animal Brucellosis, Nielsen K.H. & Duncan J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 383–409.
2. ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS, R.D. & VERGER J.M. (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA, Paris, France.
3. BARDENSTEIN S., MANDELBOIM M., FICHT T.A., BAUM M. & BANAI M. (2002). Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the PstI site polymorphism of its *omp2* gene. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 1475–1480.
4. BLASCO J.M. (1992). Diagnosis of *Brucella melitensis* infection in small ruminants. In: Prevention of Brucellosis in the Mediterranean Countries, Plommet M., ed. Pudoc Scientific, Wageningen, The Netherlands, 272–277.
5. BLASCO J.M. (1997). A review on the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.*, **31**, 275–283.
6. BLASCO J.M., GARIN-BASTUJI B., MARIN C.M., GERBIER G., FANLO J., JIMENEZ DE BAGUES M.P. & CAU C. (1994). Efficacy of different rose bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Rec.*, **134**, 415–420.
7. BOSSERAY N. (1991). *Brucella melitensis* Rev.1 attenuated vaccine: Stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals*, **19**, 355–363.

8. BOSSERAY N. (1992). Le vaccin Rev.1: dérive des caractères d'immunogénicité et de virulence indépendante des marqueurs classiques. *In: Prevention of Brucellosis in the Mediterranean Countries*, Plommet M., ed. Pudoc Scientific, Wageningen, The Netherlands, 182–186.
9. BOSSERAY N. (1993). Control methods and thresholds of acceptability for anti-*Brucella* vaccines. *Dev. Biol. Stand.*, **79**, 121–128.
10. CLOECKAERT A., BAUCHERON S., VIZCAINO N. & ZYGMUNT M.S. (2001). Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, **8**, 772–775.
11. CLOECKAERT A., DEBBARH H.S., VIZCAINO N., SAMAN E., DUBRAY G. & ZYGMUNT M.S. (1996). Cloning, nucleotide sequence and expression of the *Brucella melitensis* bp26 gene coding for a protein immunogenic in infected sheep. *FEMS Microbiol. Lett.*, **140**, 139–144.
12. CLOECKAERT A., GRAYON M. & GRÉPIENT O. (2002). Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. *Vaccine*, **20**, 2546–2550.
13. DEBBARH H.S., ZYGMUNT M.S., DUBRAY G. & CLOECKAERT A. (1996). Competitive ELISA using monoclonal antibodies to the *Brucella melitensis* bp26 protein to evaluate antibody response in infected and *B. melitensis* Rev1 vaccinated sheep. *Vet. Microbiol.*, **53**, 325–337.
14. DÍAZ-APARICIO E., MARÍN C., ALONSO B., ARAGÓN V., PÉREZ S., PARDO M., BLASCO J.M., DÍAZ R. & MORIYÓN I. (1994). Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1159–1165.
15. GARIN-BASTUJI B., BLASCO J.M., GRAYON M. & VERGER J.M. (1998). *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. *Vet. Res.*, **29**, 255–274.
16. GRILLO M.J., BOSSERAY N. & BLASCO J.M. (2000). *In vitro* markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial *Brucella melitensis* Rev.1 and *Brucella abortus* B19 vaccines. *Biologicals*, **28**, 119–127.
17. JOINT FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON BRUCELLOSIS (1986). Technical Report Series 740, Sixth Report. WHO, Geneva, Switzerland.
18. MACMILLAN A. (1990). Conventional serological tests. *In: Animal Brucellosis*, Nielsen K.H. & Duncan J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 153–197.
19. MARIN C.M., MORENO E., MORIYON I., DIAZ R. & BLASCO J.M. (1999) Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis sheep brucellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 269–272.
20. ROSSETTI O., ARESE A., BOSCHIROLI L. & CRAVERO S. (1996). Cloning of *Brucella abortus* gene and characterisation of expressed 26 kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 165–169.
21. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1977). Requirements for *Brucella melitensis* strain Rev.1 vaccine (Live – for veterinary use). World Health Organization (WHO) Technical Report Series No. 610, 28th Report, Annex 4. WHO, Geneva, Switzerland, 85–97.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la brucellose ovine et caprine (infection à *Brucella ovis* exclue) (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).

ARTHRITE-ENCÉPHALITE CAPRINE ET MAEDI-VISNA

RÉSUMÉ

Le Maedi-visna (MV) du mouton et l'arthrite/encéphalite caprine (CAE) sont des infections virales persistantes dues à des lentivirus souvent regroupés sous le nom de lentivirus des petits ruminants (SRLV = small ruminant lentiviruses). Le Maedi-visna est aussi connu sous le nom de pneumonie progressive ovine. Des analyses phylogénétiques du virus du MV (MVV) et du virus de la CAE (CAEV) ont démontré qu'il s'agit de lentivirus étroitement apparentés. La première transmission du virus MV aux agneaux ou du CAEV aux chevreaux se fait par le colostrum ou le lait pendant l'allaitement. Une éventuelle transmission horizontale en l'absence de lactation n'est pas démontrée ; cependant les fèces et le liquide pulmonaire sont connus pour contenir du virus infectieux. Des lentivirus ovins ont été identifiés dans la plupart des pays éleveurs de moutons dans le monde, toutefois il faut noter l'exception remarquable de l'Australie et de la Nouvelle Zélande. C'est dans les pays industrialisés que le CAEV est le plus répandu, sa distribution semble avoir coïncidé avec les mouvements internationaux des races européennes de chèvres laitières. Les signes cliniques et subcliniques du MV et de la CAE sont caractérisés par l'installation progressive de lésions inflammatoires à cellules mononucléées dans les poumons, les articulations, la mamelle et le système nerveux central. Une mammite indurative est commune dans les deux espèces, son importance économique est souvent sous-estimée. Une respiration difficile associée à un amaigrissement extrême causé par la pneumonie progressive est le tableau prédominant observé chez les moutons cliniquement atteints, alors que chez les chèvres la maladie observée est surtout une polyarthrite. Cependant, La plupart des moutons et des chèvres infectés par les lentivirus sont en grande partie asymptomatiques, mais demeurent des porteurs permanents de virus, capables de transmettre l'infection par le colostrum, le lait ou leurs sécrétions respiratoires. Pour confirmer un diagnostic de MV ou de la CAE, l'approche la plus pratique et la plus fiable est une association de la sérologie et de l'évaluation clinique. Bien que la sérologie représente la méthode la plus efficace de diagnostic des animaux infectés chroniques sans signes cliniques, il faut bien comprendre que les épreuves sérologiques peuvent donner des résultats erronés. La fréquence des erreurs dépend de plusieurs facteurs et notamment de : 1) le type d'épreuve, 2) l'homologie entre les souches virales utilisées dans l'épreuve et les souches présentes dans la population à tester et 3) l'antigène viral utilisé dans l'épreuve.

Identification de l'agent pathogène : *l'isolement du virus peut être tenté à partir de cas cliniques ou subcliniques vivants, par coculture du sang périphérique ou de leucocytes du lait avec des cultures de cellules ovines ou caprines appropriées, comme les cellules de plexus choroïdes (MVV), ou de membrane synoviale (CAEV). L'isolement du virus est très spécifique mais sa sensibilité est variable. Il est plus facilement obtenu après l'autopsie par la mise en culture d'explants de tissus infectés, par ex. poumon, plexus choroïde, membrane synoviale ou mamelle. Egalement, des macrophages alvéolaires obtenus post-mortem à partir des poumons peuvent être mis en coculture avec des cellules sensibles. On obtient des effets cytopathiques caractéristiques, avec l'apparition de cellules réfringentes étoilées et de syncytiums. La présence de MVV ou de CAEV peut être confirmée par les techniques d'immunomarquage et la microscopie électronique.*

Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques : *plusieurs techniques de réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), soit classiques (nombreuses), soit quantitatives, (peu nombreuses) ont été décrites et sont maintenant utilisées en routine dans de nombreux laboratoires pour la détection rapide, l'identification et le titrage des souches de lentivirus des petits*

ruminants. Le clonage et/ou le séquençage des produits issus de la PCR sont les méthodes les plus évidentes pour confirmer la spécificité de ces produits.

Épreuves sérologiques : *la plupart des moutons et des chèvres infectés sont porteurs d'anticorps spécifiques détectables qui peuvent être recherchés par un certain nombre d'épreuves sérologiques différentes. Deux méthodes sont le plus souvent utilisées, l'immunodiffusion en gélose et la méthode immuno-enzymatique (ELISA). Le western blot (immuno-empreinte) et le test de radio-immunoprécipitation sont également utilisés, mais seulement dans des laboratoires très spécialisés. Un test ELISA détectant les anticorps du lait peut être utilisé pour les troupeaux caprins laitiers. La période de temps requise entre l'infection et la séroconversion peut être relativement longue et difficile à prévoir, elle se mesure en mois plutôt qu'en semaines. Cependant, après la séroconversion, la réponse anticorps est le plus souvent persistante, et les moutons et les chèvres séropositifs doivent être considérés comme des porteurs de virus.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *il n'y a pas de réactifs biologiques disponibles.*

A. INTRODUCTION

Le Maedi-visna du mouton (MV), et l'arthrite/encéphalite caprine (CAE) sont des infections virales persistantes causées par des lentivirus étroitement apparentés (34). Le Maedi-visna est aussi connu sous le nom de pneumonie progressive ovine. Les moutons peuvent être infectés expérimentalement avec le virus de la CAE et les chèvres avec le virus du MV (4). En outre, les analyses phylogénétiques comparant les séquences nucléotidiques du virus du MV (MVV) et du virus de la CAE (CAEV pour *caprine arthritis-encephalitis virus*) indiquent clairement l'existence et l'importance épidémiologique de transmissions croisées inter-espèces entre moutons et chèvres, sans qu'il ait été démontré clairement si un virus a émergé à partir de l'autre (17, 23, 28, 37, 40, 41, 45, 47). Le MV et la CAE sont caractérisés par la persistance, tout au long de la vie de l'hôte, de l'agent causal dans les monocytes et les macrophages, et par une période de temps très variable entre l'infection et l'induction d'une réponse anticorps antivirale sérologiquement détectable. Une grande partie des moutons et des chèvres infectés ne présentent pas de signes cliniques de maladie, mais restent infectés en permanence et peuvent transmettre le virus (2, 5, 7).

Le Maedi-visna est un nom islandais décrivant deux des syndromes cliniques reconnus chez les moutons infectés par le MVV. « Maedi » signifie « dyspnée et difficultés respiratoires » et décrit la maladie associée à une pneumonie progressive intersticielle, et « visna » signifie « dépérissement » ou « état d'apathie progressive », signes associés à une méningoencéphalite paralysante. Alors que la maladie pulmonaire progressive est le principal symptôme observé dans l'infection à MVV, une polyarthrite chronique, avec synovite et bursite, est la principale manifestation clinique de l'infection à CAEV. Une encéphalite peut être observée principalement chez des chevreaux âgés de 2 à 6 mois infectés par le CAEV, mais un diagnostic différentiel soigneux doit être porté afin d'éliminer d'autres infections ou syndromes des chevreaux. Une mammite indurative apparaît dans les deux syndromes. Les poumons des moutons atteints de MV ne s'affaiblissent pas quand on les retire du thorax, et souvent gardent l'empreinte des côtes. Les poumons et les nœuds lymphatiques ont un poids augmenté (jusqu'à 2-3 fois le poids normal). Les lésions ont une distribution uniforme à travers les poumons, qui sont uniformément décolorés ou de couleur marbrée gris-marron et de texture ferme. Les mamelles atteintes par le MV présentent des indurations diffuses, les nœuds lymphatiques associés pouvant être hypertrophiés.

En cas de suspicion de maladie clinique de MV ou de la CAE, on peut arriver à une confirmation du diagnostic en associant l'étude clinique, la sérologie et, si nécessaire, l'examen histologique des tissus appropriés collectés à l'autopsie. Les tissus qu'il importe d'examiner sont les poumons en cas de pneumonie progressive intersticielle, le cerveau et la moelle épinière pour la méningoencéphalite, la mamelle pour la mammite indurative, les articulations affectées et les synoviales en cas d'arthrite, et les reins en cas de vasculite (6, 9, 10, 26, 30, 31). La nature de la réaction inflammatoire est la même dans les différentes localisations, consistant en une réaction intersticielle à cellules mononucléées, avec quelquefois d'importants agrégats de cellules lymphoïdes et formation de follicules.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

L'isolement et la caractérisation du MVV ou du CAEV ne sont pas normalement tentés dans le cadre d'un diagnostic de routine. Étant donnée la nature persistante de ces infections, l'établissement d'un statut positif en

anticorps suffit à identifier les animaux porteurs de virus. Cependant, en raison de la séroconversion tardive après l'infection, on peut trouver des sérologies négatives chez des animaux récemment infectés.

Il y a deux approches pour l'isolement des virus MVV et CAEV : la première est mise en œuvre à partir de l'animal vivant, la deuxième est utilisée sur des tissus prélevés à l'autopsie.

a) Isolement à partir de l'animal vivant

- **Virus Maedi-visna**

L'ADN proviral du MVV est transporté dans les monocytes circulants et les macrophages tissulaires. C'est pourquoi l'isolement du virus sur l'animal vivant nécessite de réaliser des préparations de leucocytes, avec les précautions d'asepsie, obtenues à partir du sang périphérique ou du lait pendant la lactation, et leur culture avec des cellules indicatrices. Les cellules de plexus choroïde de mouton (SCP) sont fréquemment utilisées dans ce but. Ces cellules permissives au MVV peuvent être préparées comme cultures d'explants primaires provenant de fœtus ou d'agneaux nouveau-nés indemnes de virus, leur nombre peut être multiplié après 3 à 4 passages avant stockage en azote liquide. Les cellules de SCP récupérées sont alors utilisables en coculture pour au maximum 10 ou 15 passages. Au-delà, même si elles continuent à bien cultiver, leur sensibilité au MVV peut être réduite.

Les leucocytes peuvent être préparés à partir du sang circulant sous forme de « buffy coat » en centrifugeant 15 min à 1 000 **g** les échantillons de sang qui sont recueillis sur héparine, ou sur acide éthylène diamino-tétra-acétique (EDTA) ou sur citrate. Les cellules sont aspirées, remises en suspension dans la solution équilibrée de Hanks (HBSS), puis purifiées par une centrifugation de 40 min à 400 **g** sur coussin approprié (par ex. Ficoll Paque [Pharmacia]). Les cellules récupérées à l'interface subissent un ou deux cycles de lavage-centrifugation basse (« spin-washing ») durant 10 min à 100 **g**, et le culot final est resuspendu dans le milieu à une concentration d'environ 10⁶ cellules/ml ; les cellules sont généralement cultivées durant 10 à 12 jours en sacs de Téflon, elles sont ensuite déposées sur un tapis monocellulaire lavé de cellules SCP légèrement subconfluentes dans un flacon de 25 cm² de surface.

De même, les leucocytes peuvent être obtenus en culot par centrifugation à partir du lait, remis en suspension après centrifugation-lavage et finalement ajoutés à un tapis de culture de SCP.

Ces cultures sont maintenues à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂, en changeant de milieu et en faisant un nouveau passage quand c'est nécessaire. Elles sont examinées pour la recherche d'effet cytopathique (ECP) caractérisé par l'apparition de cellules réfringentes en étoile avec prolongements dendritiques, accompagnée de la formation de syncytiums. Les cultures doivent être maintenues et observées durant plusieurs semaines avant de pouvoir être éliminées (non infectées). Quand un ECP est suspecté, des cultures sur lamelle doivent être préparées. Ces cultures sont fixées, et la mise en évidence d'antigène viral se fait par immunomarquage, le plus souvent par les techniques d'immunofluorescence indirecte ou d'immunoperoxydase indirecte. D'autre part, les cellules de tapis cellulaire suspect sont récupérées par centrifugation, et des préparations sont faites en vue d'identifier, par la microscopie électronique à transmission, des particules caractéristiques des lentivirus. Une activité reverse transcriptase dans le surnageant de culture est une indication de la présence de rétrovirus.

- **Virus de l'arthrite/encéphalite caprine**

Les mêmes principes que l'on applique à l'isolement du MVV s'appliquent également à l'isolement du CAEV. À l'origine, le virus de la CAE a été isolé par explantation de la membrane synoviale provenant d'une chèvre arthritique (6). Pour les chèvres vivantes infectées par le CAEV, le sang circulant, le lait, et le liquide articulaire (si on peut le prélever) représentent les sources les plus intéressantes pour préparer des leucocytes. Les cellules permissives de membrane synoviale de chèvre (GSM) sont un bon indicateur. Si on soupçonne un ECP, il est nécessaire de mettre en œuvre des tests de détection de l'antigène viral, comme indiqué ci-dessus.

b) Isolement à partir de tissus après autopsie

- **Virus de l'arthrite/encéphalite caprine et du Maedi-visna**

Les échantillons de tissus suspects, collectés aussi fraîchement que possible (poumons, membranes synoviales, mamelle, etc.), sont recueillis aseptiquement dans du milieu HBSS ou un milieu de culture cellulaire et découpés finement dans une boîte de Petri au moyen de lames de scalpel. Les fragments individuels sont transférés à la pipette Pasteur dans des flacons de 25 cm², environ 20 à 30 fragments par flacon, et une goutte de milieu nutritif est placée soigneusement sur chaque fragment. Les flacons sont alors incubés à 37 °C en atmosphère humide à 5 % de CO₂, et laissés au repos pendant quelques jours pour permettre aux explants individuels d'adhérer au plastique. On ajoutera très soigneusement du milieu frais,

après quoi des amas de cellules vont progressivement se développer à partir des fragments. Quand cette prolifération est suffisante, les cultures sont dispersées par trypsination, pour permettre le développement de tapis cellulaires. Ceux-ci peuvent être examinés pour l'ECP, et toute suspicion de multiplication virale doit être confirmée de la même façon que pour les cocultures.

Des cultures de macrophages adhérents sont faciles à établir à partir du liquide résultant du rinçage des poumons (liquide de lavage broncho-alvéolaire obtenu *post mortem*). La production de virus peut être testée dans ce liquide en une à deux semaines par la sérologie, la microscopie électronique, ou la recherche de la reverse transcriptase. Des isollements de virus peuvent être pratiqués par coculture de macrophages sur des cellules SCP ou GSM comme il a été décrit ci-dessus pour les leucocytes.

c) Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques

La plupart des laboratoires de diagnostic des maladies à virus sont très probablement équipés pour les méthodes basiques de culture cellulaire décrites ci-dessus. De nombreux laboratoires maintenant peuvent aussi mettre en œuvre les méthodes de reconnaissance des acides nucléiques pour la détection, l'identification et la quantification de l'ADN proviral du MV et de la CAE, en utilisant les méthodes classiques de réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) suivie de Southern blot et de l'hybridation *in situ*, ou le clonage et le séquençage des produits de la PCR (3, 19, 22). Des techniques de PCR classique pour la détection de l'ADN proviral du MV et de la CAE dans les cellules et les tissus ont été décrites et sont utilisées en routine dans de nombreux laboratoires ; elles sont en général utilisées comme complément à la sérologie, pour déterminer le statut infectieux d'animaux ne pouvant pas être franchement diagnostiqués par les techniques sérologiques (13, 24). Des techniques de PCR en temps réel ou quantitatives commencent à être utilisées dans quelques laboratoires et ces tests, en plus de déterminer le statut infectieux, permettent aussi de mesurer la quantité de provirus du MV ou de la CAE présent chez l'animal (3, 19). Des techniques de biologie moléculaire supplémentaires, telles que la PCR suivie du clonage et du séquençage, apportent aussi des renseignements sur la région ou le pays d'origine des souches de MV ou de la CAE, ce qui peut influencer le choix de l'épreuve sérologique et de l'antigène de MV ou de la CAE à mettre en œuvre. Des analyses phylogénétiques de l'ADN proviral du MVV et du CAEV à partir de souches de SRLV du monde entier laissent à penser que, dans certaines régions, le MV a pu naturellement infecter des chèvres et que la CAE a pu infecter naturellement des moutons (40, 41). Il est possible qu'à l'avenir des tests de diagnostic moléculaire associés à des analyses phylogénétiques puissent retracer la transmission des infections.

La spécificité de la PCR est une question importante lors de son utilisation. En raison de la possibilité d'amplification de séquences non spécifiques à partir de l'ADN génomique de l'hôte (faux positifs), le produit amplifié doit être vérifié par hybridation, profils de digestion par des endonucléases de restriction ou par séquençage. La spécificité des épreuves basées sur la PCR est apportée par le séquençage du produit amplifié et est recommandé par l'OIE. La sensibilité est améliorée en travaillant avec des épreuves de PCR nichée, mais la spécificité de ces épreuves doit être vérifiée par des méthodes d'hybridation, de profils de digestion par endonucléases de restriction ou par séquençage.

2. Épreuves sérologiques

Les infections à lentivirus ovins et caprins étant persistantes, la détection d'anticorps est un outil sérologique précieux pour l'identification des porteurs de virus. La relation antigénique étroite entre les virus MVV et CAEV, ne permet pas la détection d'anticorps hétérologues dans certaines épreuves sérologiques (25).

Les méthodes les plus couramment utilisées pour le diagnostic sérologique des infections par les SRLV sont l'immunodiffusion en gélose (IDG) et la méthode immuno-enzymatique (ELISA). L'IDG, décrite en 1973, a été la première à être développée (44), et l'ELISA a été décrit pour la première fois en 1982 (20). L'IDG est spécifique, reproductible et simple à réaliser, mais une certaine expérience est requise pour une bonne lecture des résultats. L'ELISA est économique et donne des résultats quantitatifs ; il est automatisable dans ses différentes étapes, ce qui le rend utile pour le dépistage sur un grand nombre de sérums. La sensibilité et la spécificité de l'IDG et de l'ELISA dépendent des souches virales utilisées dans le test, de la préparation de l'antigène viral et des réactifs de référence utilisés dans les essais comparatifs. Le Western blot et les épreuves de radio-immunoprécipitation sont les épreuves de référence pour évaluer la sensibilité et la spécificité de l'IDG et de l'ELISA.

a) Immunodiffusion en gélose (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

On trouve chez les virus du MV et de la CAE deux antigènes viraux d'importance majeure en sérologie de routine, une glycoprotéine d'enveloppe virale communément dénommée SU ou gp135, et une protéine de capside, dénommée CA ou p28. Ces deux antigènes sont conservés dans une préparation antigénique consistant en un surnageant de culture cellulaire infectée qui a été concentré environ 50 fois par dialyse

contre du polyéthylène glycol. La souche sauvage WLC-1 de MV est utilisée pour l'IDG aux États-Unis d'Amérique (8)¹. Au Canada, il s'agit d'une souche MV canadienne prélevée sur le terrain (43).

Il est important de reconnaître que la sensibilité de l'IDG pour la détection des anticorps anti-CAEV dépend à la fois de la souche et de l'antigène viral utilisés (1, 25). Il a été démontré qu'un test IDG utilisant la gp135 de CAEV apportait une bien meilleure sensibilité que l'IDG réalisée avec la p28 de CAEV (1). De plus, il a été montré, en prenant comme référence la radio-immunoprécipitation, que la sensibilité de la réaction d'IDG pour la recherche d'anticorps anti-CAEV était, en utilisant l'antigène viral CAEV, de 35 % supérieure à la sensibilité obtenue avec l'antigène du virus MV (25). L'explication la plus probable pour cette différence de sensibilité entre les antigènes des virus CAE et MV dans la détection d'anticorps anti-CAEV est la suivante : l'épreuve de radio-immunoprécipitation ne requiert que la liaison d'un seul épitope par anticorps pour donner un résultat positif, alors que la précipitation en gel d'agarose nécessite de multiples interactions épitope-anticorps. Bien que les virus du MV et de la CAE présentent une homologie de 73 % à 74,4 % dans la séquence des nucléotides du gène de l'enveloppe (17), ce degré d'identité peut ne pas suffire pour entraîner la production d'anticorps en quantité suffisante vis-à-vis des épitopes communs du MVV et du CAEV, ce qui se traduit par des lignes de précipitation anticorps/antigène indétectables lorsque l'antigène viral MV est utilisé. Quand on utilise l'antigène approprié, l'IDG est un test performant. Comparée à l'immunoprécipitation, l'IDG, en détection d'anticorps anti-CAEV, en utilisant l'antigène CAEV, a montré une sensibilité de 92 % et une spécificité de 100 % (25). En outre, avec l'antigène MVV, l'IDG pour la détection des anticorps anti-MVV a une spécificité de 99,3 % et une sensibilité de 99,4 % (16).

Chez les moutons infectés persistants par le MVV et chez les chèvres infectées par le CAEV, la réponse prédominante en anticorps précipitant est dirigée contre l'antigène gp135 (18, 26). Une réponse anti-p28 est habituellement présente mais, chez les moutons adultes infectés persistants, son titre est plus faible que pour la réponse anti-gp135 en immunoprécipitation. Dans quelques cas de chèvres infectées par le CAEV, on a pu mettre en évidence la production d'une réponse anti-gp135 en absence de réponse anti-p28 et vice-versa, au niveau individuel (11, 36). C'est pourquoi il est indispensable pour valider un test d'utiliser des sérums de référence qui produisent à la fois les lignes de précipitation anti-gp135 et anti-p28.

Le milieu gélosé est composé d'agarose à 0,7–1 % en tampon 0,05 M Tris pH 7,2, avec 8 % de NaCl. Le test est commodément réalisé en boîtes de Petri en plastique, ou en plateaux de matière plastique de 10 cm². La disposition et la taille des puits vont déterminer le nombre de sérums qui seront testés sur la plaque. Différentes dispositions de puits peuvent être adoptées, mais il est usuel d'utiliser un arrangement hexagonal avec un puits central : par exemple, une disposition alternant en périphérie des grands puits (diamètre 5 mm) et des petits puits (diamètre 3 mm), éloignés de 2 mm et distants de 2 mm d'un puits central d'antigène (de 3 mm de diamètre). En périphérie, les grands puits contiennent les sérums à tester, et les petits puits contiennent les sérums de référence. Un sérum témoin positif faible doit être inclus dans chaque test. Les boîtes sont incubées toute la nuit en chambre humide entre 20 et 25 °C, ensuite on examine les lignes de précipitation. Pour accroître les lignes de précipitation, l'incubation peut être prolongée entre 2 et 8 °C pendant 24 h.

Il est important de noter que l'interprétation de l'IDG nécessite un personnel expérimenté. L'interprétation des résultats dépend des antigènes utilisés. Des exemples de réactions d'IDG réalisées avec différentes préparations antigéniques, ainsi qu'un guide pour l'interprétation des résultats peuvent être trouvés dans la ref. 2.

b) Méthode immuno-enzymatique (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

À l'heure actuelle, Il existe plus d'une trentaine de tests ELISA différents pour la détection des anticorps anti-MVV ou anti-CAEV dans le sérum des moutons et des chèvres (13). La plupart du temps, il s'agit d'ELISA indirects (i-ELISA) mais 3 ELISA de compétition (c-ELISA) utilisant des anticorps monoclonaux ont été décrits (14-16, 21). Pour une moitié des i-ELISA, l'antigène est constitué de virus total, tandis que pour l'autre moitié, il s'agit de protéines recombinantes et/ou d'antigènes peptidiques synthétiques. Quelques uns de ces i-ELISA se sont révélés hautement spécifiques et sensibles quand ils ont été comparés à des épreuves de référence, western blot ou radio-immunoprécipitation (27, 38, 39). De même, comparé à la radio-immunoprécipitation, un c-ELISA a montré aux États-Unis, une grande sensibilité et une grande spécificité tant avec les sérums de moutons que les sérums de chèvres, ce qui laisse à penser que ce c-ELISA seul pourrait être employé aux États-Unis pour la surveillance à la fois du MV et de la CAE (15, 16). Bien que les tests ELISA aient été employés pendant de nombreuses années dans plusieurs pays européens (33) dans des programmes de contrôle et d'éradication du MV chez les moutons (29) et de la CAE chez les chèvres, l'IDG reste le test le plus fréquemment utilisé.

1 Ce virus est distribué par le Dr Howard Lemkuhl, National Animal Disease Center, United States Department of Agriculture, P.O. Box 70, Ames, Iowa, USA.

Les antigènes sont préparés à partir de virus complets par centrifugation différentielle du surnageant de cultures cellulaires infectées et par traitement avec des détergents des virus purifiés ; les microplaques sont alors sensibilisées avec ces antigènes (12, 42, 46). Les préparations à partir de virus complet doivent contenir les deux protéines gp135 et p28. Les antigènes recombinants ou les peptides synthétiques sont en général produits à partir des gènes *gag* ou *enveloppe* (ou de segments de ces gènes) et peuvent être utilisés en association (27, 35, 38, 39). Ainsi, les produits obtenus à partir des gènes *gag* et *enveloppe* fusionnés avec la protéine de fusion glutathion S-transférase produite dans *Escherichia coli* constituent-ils une source régulière d'antigène pour les besoins de la distribution internationale et de la normalisation.

La technique ELISA est aussi applicable au colostrum ou au lait, et quelques études ont évalué son application sur des paires de prélèvements de sérum et de lait. Étant donné que les sources de la transmission du CAEV sont le colostrum et le lait, la recherche dans des échantillons de lait d'anticorps anti-CAEV ou anti-MVV pourrait ne pas fournir à temps l'information nécessaire à la prévention de la transmission du virus, particulièrement aux jeunes issus de la gestation en cours au moment du test (24).

L'ELISA est réalisé à température ambiante (~25 °C) et est facile à conduire dans les laboratoires équipés du matériel nécessaire (lecteur de microplaques) et possédant les réactifs requis. Ce test convient bien pour le dépistage à grande échelle (« screening »), particulièrement en diagnostic vétérinaire, et c'est une technique quantitative fiable pour la mise en évidence d'anticorps contre les SRLV chez les moutons et chez les chèvres. L'ELISA nécessite un antigène bien purifié. Un inconvénient de plusieurs tests ELISA est qu'ils n'ont pas été validés par comparaison avec une épreuve de référence telle que l'analyse par western blot ou la radio-immunoprécipitation. L'OIE recommande pour la validation de ces tests 1000 échantillons connus comme étant négatifs, 300 échantillons connus comme étant positifs et l'utilisation d'une épreuve de référence pour la comparaison telle que celles mentionnées au-dessus. A l'heure actuelle un seul test ELISA est en conformité avec ces normes de validation (46).

Pour l'i-ELISA, les puits de la microplaque sont sensibilisés avec l'antigène. Les sérums dilués sont ajoutés dans les puits et réagissent avec les antigènes liés au support solide. Le matériel qui ne s'est pas lié est éliminé par lavage après une période d'incubation définie. Le conjugué (par ex. sérum ou immunoglobuline (Ig) anti-Ig de ruminant, marqué à la peroxydase) réagit avec les anticorps spécifiques liés à l'antigène. Le conjugué qui n'a pas réagi est éliminé par lavage après le temps d'incubation défini. Le substrat de l'enzyme est ajouté. Le taux de transformation du substrat est proportionnel à la quantité d'anticorps qui se sont liés. La réaction est stoppée au bout du temps nécessaire et l'intensité de la couleur qui s'est développée est mesurée au spectrophotomètre. Un inconvénient du i-ELISA est que les sérums doivent être dilués au 1/50 ou plus afin de réduire le nombre de faux positifs.

Des anticorps monoclonaux (AcM) spécifiques ont été utilisés dans un c-ELISA SRLV pour capturer les protéines gp135 et p28 (14-16, 21, 32) : ce c-ELISA surmonte ainsi le problème de la pureté de l'antigène, la spécificité du test ne dépendant que de l'épitope de l'anticorps monoclonal utilisé. Dans le c-ELISA, les échantillons de sérums (anticorps anti-SRLV) empêchent la liaison de l'AcM conjugué à une enzyme avec l'antigène SRLV fixé sur les puits de la microplaque. La fixation de l'AcM conjugué est détectée par addition d'un substrat de l'enzyme et la coloration produite par un chromogène est mesurée. Une forte coloration indique qu'il y a peu ou pas d'inhibition de la fixation de l'AcM et donc l'absence d'anticorps SRLV dans le sérum. Inversement, une faible coloration sera due à l'inhibition de la fixation de l'AcM marqué sur l'antigène (phase solide), et indiquera la présence dans les sérums d'anticorps anti-SRLV. Le c-ELISA nécessite donc que les anticorps présents dans le sérum se fixent sur ou à proximité de l'épitope reconnu spécifiquement par l'AcM.

- **Matériel et réactifs**

Plaques de microtitrage de 96 puits à fond plat, fraîchement sensibilisées avec l'antigène SRLV, ou sensibilisées à l'avance et séchées ; lecteur de microplaques (filtres à 405, 450, 490 et 620 nm) ; incubateur-chambre humide à 37 °C ; micropipettes de 1, 8 et 12 canaux avec pointes en plastique jetables ; agitateur de microplaques (optionnel) ; réfrigérateur ; congélateur.

Sérums témoins positif et négatif ; conjugué (par ex. anticorps anti-immunoglobuline de ruminant marqués à la peroxydase) ; solution de dilution concentrée 10× (ex. solution physiologique tamponnée au phosphate [PBS]/Tween) ; eau distillée ; solution de lavage 10× ; substrat ou chromogène (par ex. ABTS [2,2'-azino-bis-(acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] ou TMB [3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine]) ; solution d'arrêt (par ex. détergent, acide sulfurique).

- **ELISA indirect : protocole**

- i) Amener les échantillons de sérums et les sérums témoins à la dilution appropriée (par ex. 1/20) et distribuer 0,1 à 0,2 ml par puits (en double si ELISA biphasique). Les sérums témoins sont des sérums positifs et négatifs fournis par le fabricant, et un sérum positif de référence interne provenant du laboratoire pour comparer les titres d'un test à l'autre.

- ii) Couvrir les plaques avec un couvercle et incuber à température de la pièce ou à 37 °C pendant 30 à 90 min. Vider les puits et rincer trois fois avec la solution de lavage à température ambiante.
- iii) Ajouter la dilution appropriée de conjugué, fraîchement préparée, dans les puits (0,1 ml par puits). Couvrir chaque plaque et incuber comme dans l'étape ii. À nouveau laver 3 fois.
- iv) Ajouter dans chaque puits 0,1 ml de solution de substrat-chromogène préparée extemporanément ou prête à l'emploi (par ex. ABTS en tampon phosphate citrate, pH 5,0, et la solution à 30 % de H₂O₂ [0,1 µl/ml]).
- v) Agiter doucement la plaque ; après incubation, stopper la réaction en ajoutant à chaque puits la solution d'arrêt (par ex. 0,1 ml d'acide sulfurique dilué).
- vi) Lire l'absorbance (=DO, densité optique) de chaque puits au moyen du lecteur de microplaques à 405 nm (ABTS) ou 450–620 nm (TMB). Ces valeurs de DO sont utilisées pour calculer les résultats.
- vii) *Interprétation des résultats*

Pour les kits de diagnostic disponible dans le commerce, les interprétations et les critères de validation sont indiqués avec le kit.

Par exemple : calculer l'absorbance moyenne (Ab) du sérum, des sérums témoins positifs (Ab_{pos}) et négatif (Ab_{neg}) et pour chaque sérum calculer le pourcentage :

$$\frac{Ab - Ab_{neg}}{Ab_{pos} - Ab_{neg}} \times 100$$

Interpréter les résultats comme suit :

Pourcentage < 30 %	sérum négatif
Pourcentage 30 à 40 %	sérum douteux
Pourcentage > 40 %	sérum positif

- **ELISA de compétition : protocole**

- i) Ajouter 0,05 ml de sérum non dilué et des sérums témoins positif/négatif dans les puits correspondants de la plaque sensibilisée par l'antigène.
- ii) Incuber 1 h à température ambiante.
- iii) Vider la plaque et laver trois fois avec la solution de lavage diluée.
- iv) Ajouter dans chaque puits 0,05 ml de solution d'anticorps conjugué à la peroxydase. Mélanger bien et incubé 30 min à température de la pièce.
- v) Après une incubation de 30 min, vider la plaque et répéter l'opération de lavage comme dans l'étape iii.
- vi) Ajouter 0,05 ml de solution de substrat (ex : TMB) dans chaque puits. Mélanger doucement et couvrir la plaque avec une feuille d'aluminium (à l'abri de la lumière). Incuber 20 min à température ambiante. Ne pas vider les puits.
- vii) Ajouter 0,05 ml de solution d'arrêt dans chaque puits. Mélanger doucement. Ne pas vider les puits.
- viii) Immédiatement après ajout de la solution d'arrêt, les plaques doivent être lues sur le lecteur de plaques (à 620, 630 ou 650 nm).
- ix) *Interprétation des résultats*

Exemple de calcul : $100 - [(DO \text{ échantillon} \times 100) / (DO \text{ moyenne du témoin négatif})] = \% \text{ d'inhibition}$.

Pour les chèvres, un sérum est positif s'il cause > 33,2 % d'inhibition ; s'il cause < 33,2 % inhibition, il est négatif. Pour les moutons, un sérum est positif s'il cause > 20,9 % d'inhibition ; il est négatif s'il cause < 20,9 % d'inhibition.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'y a pas de produits biologiques disponibles. Des anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes conformationnels de la glycoprotéine d'enveloppe de CAEV, gp135, ont été décrits (32).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ADAMS D.S. & GORHAM J.R. (1986). The gp135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Res. Vet. Sci.*, **40**, 157–160.
2. ADAMS D.S., KLEVJER-ANDERSON P., CARLSON J.L., MCGUIRE T.C. & GORHAM J.R. (1983). Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 1670–1675.
3. ALVAREZ V., ARRANZ J., DALTABUIT M., LEGINAGOIKOA I., JUSTE R.A., AMORENA B., DE ANDRES D., LUJAN L.L., BADIOLA J.J. & BARRIATUA E. (2006). PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Res. Vet. Sci.*, **80**, 226–234.
4. BANKS K.L., ADAMS D.S., MCGUIRE T.C. & CARLSON J. (1983). Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 2307–2311.
5. CORK L.C. (1990). Pathology and epidemiology of lentiviral infection of goats. In: *Maedi-Visna and Related Diseases*, Petursson G. & Hoff-Jørgensen R., eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, 119–127.
6. CRAWFORD T.B. & ADAMS D.S. (1981). Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **178**, 713–719.
7. CRAWFORD T.B., ADAMS D.S., CHEEVERS W.P. & CORK L. C. (1980). Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, **207**, 997–999.
8. CUTLIP R.C., JACKSON T.A. & LAIRD O.A. (1977). Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.*, **38**, 1081–1084.
9. CUTLIP R.C., LEHMKUHL H.D., BROGDEN K.A. & MCCLURKIN A.W. (1986). Vasculitis associated with ovine progressive pneumonia virus infection in sheep. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 61–64.
10. CUTLIP R.C., LEHMKUHL H.D., WOOD R.L. & BROGDEN K.A. (1985). Arthritis associated with ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 65–68.
11. DAWSON M. (1985). The detection of precipitating antibodies to lentivirus antigens in goat sera using two immunodiffusion assays. In: *Slow Viruses in Sheep, Goats and Cattle*, Sharp J.M. & Hoff-Jørgensen R., eds. Commission of the European Communities, EUR 8076, 233–238.
12. DAWSON M., BIRONT P. & HOUWERS D.J. (1982). Comparison of serological tests used in three state veterinary laboratories to identify maedi-visna virus infection. *Vet. Rec.*, **111**, 432–434.
13. DEANDRES D., KLEIN D., WATT N.J., BERRIATUA E., TORSTEINSDOTTIR S., BLACKLAWS B.A. & HARKISS G.D. (2005). Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.*, **107**, 49–62.
14. FREVEREIRO M., BARROS S. & FUGULHA T. (1999). Development of a monoclonal antibody blocking-ELISA for detection of antibodies against Maedi-Visna virus. *J. Virol. Methods*, **81**, 101–108.
15. HERRMANN L.M., CHEEVERS W.P., MCGUIRE T.C., ADAMS D.S., HUTTON M.M., GAVIN W.G. & KNOWLES D.P.A. (2003a). A competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV): a diagnostic tool for successful eradication. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10**, 267–271.
16. HERRMANN L.M., CHEEVERS W.P., MARSHALL K.L., MCGUIRE T.C., HUTTON M.M., LEWIS G.S., KNOWLES D.P. (2003b). Detection of serum antibodies to ovine progressive pneumonia virus in sheep by using a caprine

- arthrits-encephalitis virus competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10**, 862–865.
17. HERRMANN L.M., HOTZEL I., CHEEVERS W.P., ON TOP K.P., LEWIS G.S. & KNOWLES D.P. (2004). Seven new ovine progressive pneumonia virus (V) field isolates from Dubois Idaho sheep comprise part of OPPV clade II based on surface envelope glycoprotein (SU) sequences. *Virus Res.*, **102**, 215–220.
18. HERRMANN L.M., MCGUIRE T.C., HOTZEL I., LEWIS G.S. & KNOWLES D.P. (2005). The surface envelope glycoprotein (SU) is B-lymphocyte immunodominant in sheep naturally infected with ovine progressive pneumonia virus (OPPV). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 797–800.
19. HERRMANN-HOESING L.M., WHITE S.N., LEWIS G.S., MOUSEL M.R. & KNOWLES D.P. (2007). Development and validation of an ovine progressive pneumonia virus quantitative PCR. *Clin. Vacc. Immunol.*, **14**, 1274–1278.
20. HOUWERS D.J., GIELKENS A.L.J. & SCHAAKE J. (1982). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi-visna virus. *Vet. Microbiol.*, **7**, 209.
21. HOUWERS D.J. & SCHAAKE J. (1987). An improved ELISA for the detection of antibodies to ovine and caprine lentiviruses, employing monoclonal antibodies in a one-step assay. *J. Immunol. Methods*, **98**, 151–154.
22. JOHNSON L.K., MEYER A.L. & ZINK M.C. (1992). Detection of ovine lentivirus in seronegative sheep by *in situ* hybridization, PCR and cocultivation with susceptible cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **65**, 254–260.
23. KARR B.M., CHEBLOUNE Y., LEUNG K. & NARAYAN O. (1996). Genetic characterization of two phenotypically distinct North American ovine lentiviruses and their possible origin from caprine-arthrits encephalitis virus. *Virology*, **225**, 1–10.
24. KNOWLES D.P. (1997). Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **13**, 1–11.
25. KNOWLES D.P., EVERMANN J.F., SCHROPSHIRE C., VANDER SCHALIE J., BRADWAY D., GEZON H.M. & CHEEVER W.P. (1994). Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine-arthrits encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 243–245.
26. KNOWLES D., CHEEVERS W., MCGUIRE T., STEM T. & GORHAM J. (1990). Severity of arthrits is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthrits-encephalitis virus. *J. Virol.*, **64**, 2396–2398.
27. KWANG J., KEEN J., CUTLIP R.C. & LITTLEDIKE E.T. (1993). Evaluation of an ELISA for detection of ovine progressive pneumonia antibodies using a recombinant transmembrane envelope protein. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **5**, 189–193.
28. LEROUX C., CHASTANG J., GREENLAND T. & MORNEX J.F. (1997). Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch. Virol.*, **142**, 1125–1137.
29. MOTH M.J. & RALSTON J.C. (1994). Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAE in milk. *Vet. Microbiol.*, **38**, 359–367.
30. OLIVER R.E., GORHAM J.R., PARISH S.F., HADLOW W.J. & NARAYAN O. (1981). Ovine progressive pneumonia: pathologic and virologic studies on the naturally occurring disease. *Am. J. Vet. Res.*, **42**, 1554–1559.
31. OLIVER R.E., GORHAM J.R., PERRYMAN L.E. & SPENCER G.R. (1981). Ovine progressive pneumonia: experimental intrathoracic, intracerebral and intra-articular infections. *Am. J. Vet. Res.*, **42**, 1560–1564.
32. OZYORUK F., CHEEVERS W.P., HULLINGER G.A., MCGUIRE T.C., HUTTON M. & KNOWLES D.P. (2001). Monoclonal antibodies to conformational epitopes of the surface glycoprotein of caprine arthrits-encephalitis virus: potential application to competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in goat sera. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 44–51.
33. PÉPIN M., VITU C., RUSSO P., MORNEX J.F. & PETERHANS E. (1998). Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet. Res.*, **29**, 341–367.

34. PETERHANS E., GREENLAND T., BADIOLA J., HARKISS G., BERTONI G., AMORENA B., ELIASZEWICZ M., JUSTE R., KRASSNIG R., LAFONT J.P., LENIHAN P., PETURSSON G., PRITCHARD G., THORLEY G., VITU C., MORNEX J.F. & PÉPIN M. (2004). Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.*, **35**, 257–274.
35. POWER C., RICHARDSON S., BRISCOE M. & PASICK J. (1995). Evaluation of two recombinant Maedi-Visna virus proteins for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to ovine lentiviruses. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2**, 631–633.
36. RIMSTAD E., EAST N., DEROCK E., HIGGINS J. & PEDERSEN N.C. (1994). Detection of antibodies to caprine arthritis/encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Arch. Virol.*, **134**, 345–356.
37. ROLAND M., MOONEY J., VALAS S., PERRIN G. & MAMOUN R.Z. (2002). Characterization of an Irish caprine lentivirus strain-SRLV phylogeny revisited. *Virus Res.*, **85**, 29–39.
38. ROSATI S., KWANG J., TOLARI F. & KEEN J.E. (1994). A comparison of whole virus and recombinant transmembrane ELISA and immunodiffusion for detection of ovine lentivirus antibodies in Italian sheep flocks. *Vet. Res. Commun.*, **18**, 73–80.
39. SAMAN E., VAN EYNDE G., LUJAN L., EXTRAMANIA B., HARKISS G., TOLARI F., GONZALEZ L., AMORENA B., WATT N.J. & BADIOLA J.J. (1999). A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 734–740.
40. SHAH C., BÖNI J., HUDER J.B., VOGT H.R., MÜLHERR J., ZANONI R., MISEREZ R., LUTZ H. & SCHÜPBACH J. (2004). Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology*, **319**, 12–26.
41. SHAW C.A., HUDER J.B., BÖNI J., SCHONMANN M., MÜLHERR J., LUTZ H. & SCHÜPBACH J. (2004). Direct evidence for natural transmission of small ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J. Virol.*, **78**, 7518–7522.
42. SIMARD C.L. & BRISCOE M.R. (1990). An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. A simple technique for production of antigen using sodium dodecyl sulfate treatment. *Can. J. Vet. Res.*, **54**, 446–450.
43. SIMARD C.L. & BRISCOE M.R. (1990). An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Maedi-visna virus in sheep. Comparison to conventional agar gel immunodiffusion test. *Can. J. Vet. Res.*, **54**, 451–456.
44. TERPSTRA C. & DE BOER G.F. (1973). Precipitating antibodies against maedi-visna virus in experimentally infected sheep. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, **43**, 53–62.
45. VALAS S., BENOIT C., GUIONAUD C., PERRIN G. & MAMOUN R.Z. (1997). North American and French caprine arthritis-encephalitis viruses emerge from ovine maedi-visna viruses. *Virology*, **237**, 307–318.
46. ZANONI R.G., VOGT H.R., POHL B., BOTTCHE J., BOMMELI W. & PETERHANS E. (1994). An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. *J. Vet. Med. B*, **41**, 662–669.
47. ZANONI R.G. (1998). Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J. Gen. Virol.*, **79**, 1951–1961.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour l'arthrite/encéphalite caprine et le Maedi-visna (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).

AGALACTIE CONTAGIEUSE

RÉSUMÉ

*L'agalactie contagieuse est un syndrome important du mouton et de la chèvre caractérisé par des mammites, des arthrites, des kératoconjunctivites et, de façon plus occasionnelle, par des avortements. *Mycoplasma agalactiae* est la principale bactérie responsable de cette maladie, mais *M. capricolum subsp. capricolum* (Mcc), *M. mycoides subsp. capri* (Mmc) (auparavant appelé *M. mycoides subsp. mycoides* LC [LC pour Large Colonies]) et *M. putrefaciens* peuvent induire une maladie similaire avec les mêmes signes cliniques, plus fréquente chez la chèvre, et qui peut être associée à des pneumonies. Des anticorps contre Mmc et Mcc ont été détectés chez des camélidés d'Amérique du Sud (alpagas, lamas et vigognes), sans que des mycoplasmes aient pu être isolés chez ces espèces.*

Identification de l'agent pathogène : le diagnostic de certitude nécessite l'isolement des mycoplasmes responsables chez les animaux infectés ; les mycoplasmes sont ensuite identifiés par des épreuves biochimiques, sérologiques et/ou de plus en plus fréquemment par des épreuves moléculaires comme l'amplification en chaîne par polymérase (PCR). Les prélèvements les plus adaptés sont le lait, le liquide d'arthrite et des écouvillons conjonctivaux et/ou auriculaires. Les 4 espèces de mycoplasmes responsables d'agalactie contagieuse croissent relativement bien dans la plupart des milieux pour mycoplasmes, bien que *M. agalactiae* ait une préférence pour les substrats contenant des sels d'acides organiques tels que le pyruvate.

Épreuves sérologiques : la détection des anticorps dans le sérum par fixation du complément ou réaction immuno-enzymatique (ELISA) permet un diagnostic rapide de la maladie, mais souffre d'un manque de sensibilité dans les troupeaux infectés chroniques. Des tests ELISA indirects sont utilisés en routine dans des programmes de contrôle de l'agalactie contagieuse à *M. agalactiae*. La confirmation de l'infection par l'isolement et l'identification du mycoplasme en cause est généralement nécessaire dans des zones reconnues jusqu'alors indemnes d'agalactie contagieuse. Les épreuves sérologiques pour *M. putrefaciens* ne sont que très rarement disponibles.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : des vaccins commerciaux contre *M. agalactiae*, à virus inactivés par le formol, sont très largement utilisés dans les pays de l'Europe du Sud où l'agalactie contagieuse est très présente ; ces vaccins ne sont pas considérés comme très efficaces. En conditions expérimentales, des vaccins à virus inactivé par le phénol et adjuvés avec la saponine contre *M. agalactiae* se sont montrés plus efficaces que les vaccins à virus inactivé par le formol. Des vaccins à virus vivants ont été utilisés en Turquie en démontrant une protection plus importante que des vaccins à virus inactivé. Un vaccin est commercialisé qui contient *M. agalactiae*, Mmc et Mcc. Des autovaccins contre Mmc et, occasionnellement, contre Mcc ont été utilisés dans certains pays. Aucun vaccin n'a été décrit contre *M. putrefaciens*, car la maladie engendrée par ce mycoplasme est considérée comme peu grave et peu répandue.

A. INTRODUCTION

L'agalactie contagieuse est une maladie des moutons et des chèvres connue depuis près de 200 ans et caractérisée par des mammites, des arthrites et des kératoconjunctivites. La maladie a été décrite en Europe, en Asie de l'Ouest, aux États-Unis d'Amérique (USA), en Afrique du Nord et est principalement causée par *Mycoplasma agalactiae* (3). Au cours des dernières années, *M. capricolum subsp. capricolum* (Mcc) et

M. mycoides subsp. *capri*¹ (auparavant dénommé *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC [LC pour *Large Colonies*]) ont été isolés dans de nombreux pays chez des moutons et des chèvres avec des signes de mammite et d'arthrite. Les signes cliniques de ces infections sont suffisamment semblables à ceux de l'agalactie contagieuse pour qu'il soit impossible de les distinguer de cette dernière. En outre, *M. putrefaciens* induit également des mammites et des arthrites chez les chèvres, qui ne sont pas distinguables de celles engendrées par l'agalactie contagieuse (25). Un consensus a été trouvé par un groupe de travail mis en place dans le cadre de l'action européenne COST² n° 826 sur les mycoplasmes des ruminants, lors d'une réunion à Toulouse, en France en 1999 : ce groupe de travail a admis que les 4 mycoplasmes pouvaient être considérés comme des agents responsables d'agalactie contagieuse.

Sur le plan clinique, la maladie causée par *M. agalactiae* est identifiée chez les animaux malades par des températures rectales élevées, de l'inappétence et une modification de la consistance du lait chez les brebis laitières suivie d'une diminution de la production laitière, souvent en 2 à 3 jours du fait d'une mammite interstitielle (3) ; des boiteries et des kératoconjunctivites affectent environ 5 à 10 % des animaux infectés. La fièvre est commune dans les cas aigus et peut être accompagnée par des signes nerveux, mais ces signes sont rares dans la plupart des cas observés qui sont fréquemment subaigus ou chroniques. Les femelles peuvent avorter. *Mycoplasma agalactiae* peut être aussi retrouvé dans les poumons (14), mais les pneumonies ne sont pas une constante. Une bactériémie est fréquente, particulièrement pour *Mmc* et *Mcc* et peut permettre l'isolement de la bactérie, alors qu'elle peut n'être que transitoirement présente dans certaines autres localisations.

L'infection à *Mmc* peut conduire à la présence simultanée de mammites, d'arthrites, de pleurésies, de pneumonies et de kératoconjunctivites. *Mmc* possède la répartition géographique la plus large parmi les mycoplasmes des ruminants, avec une présence sur l'ensemble des continents où sont élevés des petits ruminants et là où a été rapportée la présence de l'agalactie contagieuse et de la pleuropneumonie caprine (6, 18) ; cependant l'absence de laboratoires spécialisés pour le diagnostic des mycoplasmes dans de nombreux pays conduit très sûrement à une sous-estimation de l'importance de ces mycoplasmoses. *Mmc* est principalement isolé chez les chèvres, mais a été également décrit chez des ovins présentant des maladies ayant des conséquences sur la reproduction et chez des bovins présentant des signes d'arthrite ou des troubles respiratoires. Les cas apparaissent de façon sporadique, mais dans certains cas la maladie peut persister et s'étendre lentement au sein du troupeau. Après la mise-bas, la transmission de la maladie est facilitée par la lactation, et les chevreaux s'infectent par ingestion de colostrum ou de lait contaminé. La septicémie souvent associée à ce mode de contamination, avec arthrites et pneumonies, conduit à une forte mortalité chez les chevreaux (3, 6).

Bien que *Mcc* soit très largement répandu et hautement pathogène, particulièrement en Afrique du Nord, la fréquence de la maladie à *Mcc* reste faible (3). Les chèvres sont plus souvent affectées que les moutons ; la fièvre, les septicémies, les mammites et des arthrites sévères peuvent conduire rapidement à la mort des animaux atteints (3, 4). Des pneumonies peuvent être vues à l'autopsie. Les lésions sévères des articulations observées lors d'infections expérimentales sont accompagnées par des œdèmes importants péri-articulaires avec des conséquences sur les tissus avoisinant les articulations atteintes (4).

Mycoplasma putrefaciens est commun dans les troupeaux de chèvres dans l'ouest de la France et peut être isolé d'animaux avec ou sans signes cliniques (15). Il a été ainsi associé à un important foyer de mammites et d'agalacties conduisant à des arthrites sévères chez les chèvres atteintes avec des avortements et de la mortalité (mais sans hyperthermie) en Californie, aux USA (3). *Mycoplasma putrefaciens* a été aussi mis en évidence dans un foyer de polyarthrites chez des chevreaux en Espagne (25).

Des anticorps contre *Mmc* et *Mcc*, mais pas contre *M. agalactiae*, ont été détectés chez des camélidés d'Amérique du Sud, comprenant des lamas, des alpagas et des vigognes, mais sans isolement des mycoplasmes en cause (17). Ces camélidés sont affectés par des maladies évoquant les infections à mycoplasmes, incluant des polyarthrites et des pneumonies : il est probable que des mycoplasmes comme *Mmc* et *Mcc* pourront être identifiés dans le futur chez ces animaux.

1 Le sous-comité de taxonomie des Mollicutes du Comité international de systématique des Procaryotes a proposé la fusion de ces deux sous-espèces en une seule, *M. mycoides* subsp. *capri* : la décision est toujours en suspens.

2 Coopération Européenne dans le domaine de la Recherche Scientifique et Technique / European Cooperation in the field of Scientific and Technical Research

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification des bactéries

a) Sélection des prélèvements

Les prélèvements à privilégier chez les animaux vivants sont : écouvillons et sécrétions nasales, lait de femelles avec mammites ou sans signes cliniques mais avec un fort taux de morbidité/mortalité chez les chevreaux ou agneaux, liquide articulaire à partir des articulations atteintes, écouvillons conjonctivaux chez les animaux avec atteinte oculaire, ainsi que du sang pour la recherche d'anticorps chez des animaux atteints ou apparemment sains (19). Le conduit auriculaire a été reconnu comme étant aussi une source riche en mycoplasmes pathogènes ; la présence fréquente de mycoplasmes non pathogènes dans ce conduit peut cependant compliquer l'isolement et l'identification des mycoplasmes pathogènes (19). Les mycoplasmes peuvent être isolés du sang durant la phase aiguë de la maladie associée à une bactériémie. À partir des animaux morts, les prélèvements doivent comprendre : la mamelle et les nœuds lymphatiques rétromammaires, du liquide articulaire, des fragments de poumon (prélevés à la limite du tissu sain et du tissu malade) et du liquide péricardique et/ou pleural. Les prélèvements doivent être acheminés rapidement vers le laboratoire de diagnostic sous conditionnement frais et humide. Les 4 mycoplasmes responsables d'agalactie contagieuse sont faciles à isoler à partir des tissus internes, des articulations et du lait et se multiplient bien dans la plupart des milieux pour mycoplasmes, pour donner des colonies de taille moyenne ou de grande taille en 3 à 4 jours.

b) Les milieux de culture pour mycoplasmes

Les techniques usuelles pour l'isolement des mycoplasmes s'appliquent aux 4 mycoplasmes (19). De nombreux milieux ont été décrits pour l'isolement des mycoplasmes. Les milieux contenant des acides organiques tels que pyruvates ou isopropanol permettent une meilleure croissance de *M. agalactiae* (12). La formule du milieu PRM (12) est décrite comme suit :

Dans de l'eau distillée, mélanger et chauffer du sérum inactivé de porc (100 ml/litre), de la peptone spéciale (20 g/litre), de l'extrait de levure (5 g/litre), du glycérol (5 g/litre), du chlorure de sodium (5 g/l), de l'HEPES (9 g/litre), de l'extrait frais de levure (100 ml/litre), du pyruvate de sodium (5 g/litre), du rouge de phénol (12,5 ml à 0,2 %) et de l'ampicilline (200 000 unités internationales/ml) ; compléter à 1 litre avec de l'eau distillée et stériliser par filtration. Ajuster le pH du bouillon à 7,6. Préparer du milieu solide en ajoutant 10 g de gélose LabM n°1 (Bury, UK) ou de la gélose de qualité équivalente et répartir en boîtes de Petri stériles.

L'acétate de thallium (250 mg/litre), qui est toxique et inhibiteur pour certains mycoplasmes autres que ceux impliqués dans le syndrome agalactie contagieuse, peut être un constituant indispensable du milieu de transport afin de réduire la contamination bactérienne des prélèvements issus du terrain, mais doit être exclu dès que les mycoplasmes ont commencé à croître *in vitro*. Une alternative intéressante à l'acétate de thallium peut être la colistine sulfate (37,5 mg/litre).

• Protocole

- i) Faire des dilutions de dix en dix (10^1 – 10^6) du prélèvement liquide (lait, liquide synovial) ou du prélèvement de tissu homogénéisé (ou écouvillons conjonctivaux ou des oreilles) dans du milieu liquide.
- ii) Étaler quelques gouttes de chaque prélèvement sur le milieu solide et réaliser une dilution à 10 % (v/v) dans le milieu liquide.
- iii) Ensemencer les écouvillons directement sur le milieu solide.
- iv) Incuber les bouillons (avec une agitation lente) et les boîtes de Petri inoculés à 37 °C en atmosphère humide à 5 % de CO₂.
- v) Examiner les bouillons chaque jour pour rechercher les signes d'une croissance bactérienne (indiquée par un léger trouble et/ou une opalescence) ou les modifications de pH révélées par un changement de couleur ; examiner selon la même fréquence les boîtes de Petri avec une loupe binoculaire d'agrandissement ×35 pour rechercher la morphologie caractéristique des colonies de mycoplasmes « en œuf sur le plat ».
- vi) Si aucune croissance due à un mycoplasme n'est observée au bout de 7 jours, faire une sous-culture à 10 % (v/v) du bouillon dans un bouillon frais et étaler environ 50 µl de ce bouillon sur milieu solide.
- vii) Répéter comme à l'étape v). Si aucun mycoplasme n'est visible au-delà de 21 jours de culture, considérer le prélèvement comme négatif.

- viii) Si une contamination bactérienne importante est décelée (vue par une turbidité excessive), filtrer le bouillon contaminé en passant 1 ml de ce bouillon au travers un filtre de 0,45 µm et inoculer un bouillon frais.

Les prélèvements à analyser contiennent fréquemment plus d'une espèce de mycoplasme, ce qui nécessite un isolement des colonies par clonage avant de réaliser les épreuves biochimiques et sérologiques, en particulier les tests d'inhibition de croissance ou de film (GIT et FIT respectivement pour *Growth and Film Inhibition Tests*). Le clonage est une opération longue à réaliser demandant au minimum 2 semaines, ce qui conduit à préférer d'autres épreuves d'identification ne nécessitant pas cette étape de clonage : l'épreuve d'immunofluorescence (5), l'épreuve dite « dot immunobinding test » (21) et, plus récemment la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) (voir la section B.1.e). Ces épreuves permettent l'identification rapide des mycoplasmes pathogènes à partir de mélanges contenant plusieurs espèces de mycoplasmes.

c) Épreuves biochimiques

La première épreuve à réaliser sur les cultures clonées de mycoplasmes à identifier est l'épreuve à la digitonine, qui permet la séparation des mycoplasmes et des acholéplasmes, qui sont des contaminants usuels capables de croître et de masquer les mycoplasmes intéressants. La croissance (i) en milieu liquide contenant du glucose (1 %), de l'arginine (0,2 %), et du phénol-phthaléine diphosphate (0,01 %) pour la recherche d'un film de croissance, et (ii) sur milieu gélosé contenant du sérum de cheval ou du jaune d'œuf pour rechercher la protéolyse de la caséine ou du sérum coagulé figurent parmi les épreuves les plus utiles pour différencier les 4 mycoplasmes responsables d'agalactie contagieuse (22). Ces caractéristiques biochimiques restent d'une valeur diagnostique limitée, en raison d'une variabilité individuelle des mycoplasmes. La caractéristique biochimique la plus pertinente permettant de différencier *M. putrefaciens* des autres mycoplasmes est l'odeur de putréfaction si typique de cette espèce de mycoplasme. D'autres propriétés peuvent être utiles comme par exemple la formation d'un « film » (= cristallisation en surface) ou de « spots » (= cristallisation sous forme de précipités) à la surface des cultures âgées avec *M. agalactiae*, et dans une moindre mesure avec *M. putrefaciens*, ou encore l'activité protéolytique de *Mcc* et *Mmc* sur la caséine et le sérum coagulé.

Une épreuve biochimique rapide et facile à mettre en œuvre et exploitant l'activité C8-estérase de *M. agalactiae* a été décrite (11). Les mycoplasmes forment des colonies rouges sur gélose en 1 h après l'ajout du substrat chromogène, le « SLP-octanoate » (un ester nouvellement synthétisé à partir d'acide gras en C8 et d'un chromophore phénolique). Cette propriété est commune avec l'espèce *M. bovis* qui est très rarement retrouvée chez les petits ruminants. Les souches ne nécessitent pas de clonage car *M. agalactiae* peut être identifié facilement dans un mélange. Si nécessaire, la PCR peut être utilisée pour distinguer rapidement *M. agalactiae* de *M. bovis* (voir Section B.1.e).

d) Identification sérologique

L'identification d'isolats à l'aide d'antisérums spécifiques est pratiquée lors des épreuves GIT et FIT (23) ou avec l'immunofluorescence indirecte (IFI) (5). Une épreuve d'immunoadhérence (*dot immunobinding test*) réalisé en microplaques de 96 puits offre des améliorations intéressantes par rapport aux autres épreuves sérologiques, telles que rapidité et grand nombre d'échantillons traités (21), mais implique une certaine subjectivité dans l'appréciation de l'intensité de la coloration. Pour *M. agalactiae*, l'inhibition de « film » est souvent plus fiable que l'inhibition de croissance utilisée pour les autres mycoplasmes et peut être utilisée en outre comme épreuve de sérodiagnostic. La formation de « film » par les mycoplasmes peut être améliorée par l'adjonction de 10 % de jaune d'œuf dans le milieu solide.

• Protocole

- i) Ensemencer avec au moins 2 dilutions d'une culture clonée de 48 h (10^{-1} et 10^{-2}) des gélases pré-séchées ; faire couler une goutte de 50 µl de culture en travers de la gélose (23) puis éliminer l'excès de liquide avec une pipette.
- ii) Laisser sécher les boîtes de Petri. Il est possible de couler 2 à 3 lignes bien séparées dans une boîte de 90 mm de diamètre.
- iii) Appliquer les disques pré-séchés de papier imbibés avec 30 µl d'antisérum spécifique ; laisser une distance d'au moins 30 mm entre chaque disque si plusieurs antisérums sont testés sur la même boîte de Petri.
- iv) Incuber les boîtes dans les mêmes conditions que pour les cultures de mycoplasmes et examiner chaque jour pour la recherche d'une inhibition.

- **Interprétation des résultats**

Une zone d'inhibition de plus de 2 mm, mesurée depuis le disque de papier jusqu'à la limite de croissance du mycoplasme est considérée comme significative. Une inhibition partielle peut être observée avec un antisérum faible, ou lorsqu'il y a mélange de mycoplasmes dans la culture. Des réactions plus fortes peuvent être obtenues si l'antisérum (60 µl) est directement versé dans un puits de 6 mm de diamètre réalisé avec un emporte-pièce ad hoc (23).

Dans l'épreuve d'immunofluorescence indirecte, les antisérums spécifiques sont appliqués sur les colonies isolées sur gélose. L'antisérum homologue reste attaché à la colonie après lavage, et l'ensemble est visualisé grâce un conjugué marqué par la fluorescéine sous un microscope à épifluorescence (5). Les contrôles doivent inclure des colonies positives et négatives, et un sérum témoin négatif. Cependant, comme pour l'épreuve d'immuno-adhérence, une certaine subjectivité est nécessaire lors de l'appréciation de l'intensité de la coloration.

Les antisérums utilisés au cours de ces réactions sont préparés à partir de souches de référence de l'espèce de mycoplasme ciblée, et la plupart des isolats de terrain peuvent être reconnus par ces antisérums. Mais l'expérience montre que certains isolats peuvent être difficilement reconnus par ces antisérums spécifiques, avec en contrepartie une reconnaissance plus intense par des antisérums produits contre d'autres espèces de mycoplasmes. Une variabilité intra-spécifique dans la composition antigénique a été décrite pour des souches de *M. agalactiae* et *Mcc*, alors que *M. putrefaciens* semble moins variable. Cette variabilité impose aux laboratoires de diagnostic de disposer de plusieurs antisérums susceptibles de reconnaître toutes les souches de l'espèce de mycoplasme à identifier.

e) **Méthodes basées sur la détection des acides nucléiques**

La PCR est désormais utilisée en routine dans de nombreux laboratoires de diagnostic et se révèle extrêmement sensible. Cette technique de biologie moléculaire permet ainsi de développer un système d'identification rapide à partir de prélèvements cliniques et de se concentrer sur les résultats positifs pour une investigation plus complète. Attention, toutefois, à ne pas considérer un résultat négatif comme définitif. Plusieurs techniques de PCR, spécifiques pour *M. agalactiae* ont été décrites et ont montré un niveau de détection (= sensibilité) identique ou presque, bien que basées sur la détection de séquences géniques différentes (1, 7, 26, 28). Ces techniques peuvent être appliquées directement pour les prélèvements obtenus par écouvillonnage (sacs conjonctivaux, oreilles) ou pour les liquides articulaires ou les prélèvements de tissus ; elles ont été mises en œuvre sur les prélèvements de lait avec une sensibilité supérieure par rapport à la culture traditionnelle (28), avec cependant des risques d'interférence liés à la présence d'inhibiteurs. La PCR peut être aussi utilisée directement sur les colonies de mycoplasmes à identifier : une culture de mycoplasmes de 24 h dans un milieu approprié facilite la détection par PCR même en présence de contaminants bactériens (18). Une nouvelle méthode basée sur la PCR, appelée électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE), qui utilise des amorces spécifiques de mycoplasmes, permet l'identification, grâce aux profils de migration, de la majorité des mycoplasmes des petits ruminants y compris les agents responsables de l'agalactie contagieuse (16). Un résultat positif, particulièrement à partir d'une zone ou région reconnue jusqu'alors indemne d'agalactie contagieuse, doit toujours être confirmé par l'isolement et l'identification du mycoplasme en cause avec les méthodes de référence.

Des techniques d'identification par PCR ont également été décrites pour *Mmc* et *Mcc* (2), et pour *M. putrefaciens* (20). En outre, une PCR multiplex a été décrite qui assure simultanément la détection de *M. agalactiae*, *Mcc* et *Mmc* (9).

- **Protocole**

Les amorces présentées ci-dessous et déduites de la séquence du gène *uvrC* sont spécifiques de *M. agalactiae* (26). Chaque épreuve PCR doit être optimisée dans chaque laboratoire utilisateur. Des témoins positifs et négatifs doivent être inclus comme contrôles lors de chaque essai.

MAGAUVR1-L CTC-AAA-AAT-ACA-TCA-ACA-AGC

MAGAUVR1-R CTT-CAA-CTG-ATG-CAT-CAT-AA

- Extraire l'ADN des isolats de mycoplasme ou à partir des prélèvements cliniques selon la méthode appropriée (4).
- Réaliser l'essai de PCR en utilisant un volume réactionnel final de 50 µl contenant : 1 µl d'ADN de l'échantillon à tester, 20 pmol de chaque amorce (voir ci-dessus), 1 mM de chaque dNTP, 10 mM de Tris/HCl à pH 8,3, 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl et 1,25 mM U de *Taq* polymérase.

- iii) Soumettre le mélange à 35 cycles d'amplification dans un thermocycleur selon la séquence suivante : 30 s à 94 °C (étape de dénaturation), 30 s à 50 °C (étape d'hybridation) et 1 min à 72 °C (étape d'élongation).
- iv) Analyser les produits de PCR en gel d'électrophorèse à 0,7 % de gélose et à 110 V pendant 2 h ; visualiser les bandes par coloration avec le bromure d'éthidium. Un fragment de 1,7 kb indique la présence de *M. agalactiae*.

2. Épreuves sérologiques

a) Fixation du complément

Un test de fixation du complément (FC) pour rechercher les anticorps contre *M. agalactiae* a été décrit ; ce test peut être appliqué aux autres mycoplasmes responsables du syndrome d'agalactie contagieuse (3). L'antigène est préparé à partir de bactéries lavées, normalisées par turbidimétrie et lysées soit par traitement aux ultra-sons soit par action du SDS (Sodium dodécyl sulfate) suivie d'une dialyse. Les sérums sont inactivés à 60 °C pendant 1 h, et la réaction est réalisée dans des microplaques avec une fixation du complément à froid durant une nuit ou à chaud à 37 °C pendant 3 h. Le système hémolytique est ensuite ajouté et la réaction est lue après la lyse complète de la cupule témoin antigène. Un résultat est positif lorsqu'il y a lyse complète à partir de la dilution du 1/40^e ou supérieure pour les mycoplasmes suivants : *M. agalactiae*, *Mcc*, et *Mmc*. Le test de FC est plutôt considéré comme une épreuve de troupeau et 10 sérums au minimum doivent être testés pour chaque troupeau en incluant si possible des cas d'agalactie récents et anciens.

Certains sérums en provenance de troupeaux indemnes peuvent réagir à la réaction de fixation du complément avec *M. agalactiae* comme antigène jusqu'à la dilution du 1/20^e, mais ces mêmes sérums ne réagissent pas le plus souvent avec les deux autres antigènes. Dans les troupeaux infectés avec *M. agalactiae*, des sérums donnant une réaction positive au 1/80^e peuvent donner des réactions croisées jusqu'au 1/40^e, le seuil de positivité, avec les deux autres antigènes. Il est souvent difficile de réaliser une bonne réaction de fixation du complément avec des sérums de piètre qualité ; dans ces cas, l'utilisation de la méthode immuno-enzymatique (ELISA) est conseillée.

b) Épreuve immuno-enzymatique

Les tests ELISA avec un antigène traité aux ultrasons ou avec le Tween 20 se sont révélés plus sensibles que le test de FC pour la détection des anticorps contre *M. agalactiae* (3). Les problèmes de spécificité des tests ELISA ont pu être résolus par l'utilisation de conjugués avec un anticorps monoclonal anti-immunoglobulines d'espèce ou avec la protéine G (13). L'utilisation de ce dernier conjugué a permis d'éprouver des sérums de nombreuses espèces susceptibles d'être infectées par les mycoplasmes, y compris les camélidés. Plusieurs kits ELISA sont désormais disponibles sur le marché et sont largement utilisés pour des enquêtes d'envergure dans certains pays comme la France et le Royaume-Uni (3, 17). Lors d'un essai de comparaison inter-laboratoires réalisé en 1998 dans le cadre de l'action européenne COST n°826 sur les mycoplasmes des ruminants, les kits de diagnostic ELISA disponibles dans le commerce ont montré de meilleures performances que les tests ELISA mis au point par les laboratoires.

Les kits de diagnostic ELISA disponibles dans le commerce ne sont pas aussi largement répandus pour les 3 mycoplasmes autres que *M. agalactiae*, ce qui explique l'utilisation dans certaines circonstances de kits de diagnostic ELISA mis au point par certains laboratoires de recherche.

c) L'épreuve « d'immunoblot »

Les épreuves d'immunoblot ont été décrites comme étant les plus sensibles et les plus spécifiques pour *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, l'agent causal de la péripneumonie bovine (voir Chapitre 2.4.9.). De telles épreuves ont aussi été décrites pour *M. agalactiae* (17, 29). La présence de bandes intenses aux tailles approximatives de 80 et 55 kDa démontre la présence d'anticorps anti-*M. agalactiae* dans les sérums testés, alors que des sérums en provenance d'animaux de troupeaux indemnes ne donnent aucune bande ou de faibles bandes à différentes tailles. La dilution des sérums au 1/50^e accroît la différence entre les sérums positifs et négatifs (17).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Des vaccins pour la prévention de l'agalactie contagieuse due à *M. agalactiae* sont très largement utilisés dans les pays européens du pourtour méditerranéen et en Asie de l'Ouest. Aucun vaccin unique cependant n'a été

universellement adopté, ce qui a conduit au fait qu'il n'existe pas à ce jour de méthodes d'élaboration et d'évaluation normalisées pour les vaccins contre l'agalactie contagieuse.

1. Vaccins contre l'infection à *Mycoplasma agalactiae*

a) Les vaccins à virus inactivé

En Europe où les vaccins à virus vivants contre *M. agalactiae* ne sont pas acceptés, l'attention des producteurs de vaccins s'est focalisée sur les vaccins à virus inactivé, la plupart avec le formol comme agent inactivant et avec des adjuvants comme l'hydroxyde d'alumine en émulsion huileuse. Les titres de ces vaccins, avant inactivation sont très élevés (de l'ordre de 10^8 – 10^{10} unités formant colonies par ml) et sont préparés à partir de souches de référence. Certains vaccins sont disponibles dans le commerce notamment une préparation trivalente comprenant *M. agalactiae*, *Mcc* et *Mmc*, mais les données sur leurs efficacités ne sont pas nombreuses. Un vaccin inactivé au formol sous forme d'émulsion huileuse a été trouvé immunogène et protecteur au cours d'un petit essai dans un troupeau de brebis laitières ; il prévient aussi la transmission de *M. agalactiae* (8).

Il est également possible que, dans certains cas, l'absence de protection chez les animaux vaccinés puisse être due à un autre mycoplasme responsable du syndrome agalactie contagieuse (10). Un vaccin multivalent inactivé au formol avec de la saponine comme adjuvant, et dans lequel sont incorporés les 4 mycoplasmes responsables, s'est révélé bénéfique dans un test préliminaire (24).

Plus récemment un vaccin à virus inactivé avec le phénol et adjuvé avec de la saponine a démontré une protection supérieure contre une épreuve virulente en comparaison avec d'autres vaccins à virus inactivé par le formol, par l'hypochlorite de sodium ou par la chaleur (30).

b) Les vaccins à *M. agalactiae* atténué

Des vaccins vivants atténués contre *M. agalactiae* ont été utilisés en Turquie pendant de nombreuses années en donnant des résultats supérieurs en termes de protection chez les brebis et les agneaux par rapport à des vaccins à virus inactivé (18). Le défaut de ces vaccins est de produire chez certains animaux vaccinés une légère infection avec excrétion transitoire de mycoplasmes. Ces vaccins vivants doivent donc être utilisés avec rigueur dans des campagnes de vaccination à l'échelle d'une région ou d'une zone afin de coordonner et réguler les mouvements des troupeaux vaccinés ou non vaccinés.

2. Vaccins contre l'infection à *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*

Il y a peu de données récentes sur la disponibilité de vaccins contre *Mmc* ; il est admis que des vaccins à virus inactivé sont largement utilisés dans les pays du pourtour méditerranéen et en Asie ce qui laisse penser à une production et une utilisation locale (3). En Inde, il a été signalé que des vaccins saponinés avaient induit une réponse humorale élevée et avaient apporté une certaine protection (27).

3. Infections à *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* et *M. putrefaciens*

Bien que les infections à *Mcc* et *M. putrefaciens* puissent être sévères, leur faible prévalence n'a pas encouragé le développement de vaccins contre ces deux maladies animales.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BASHIRUDDIN J.B., FREY J., KÖNIGSSON M.H., JOHANSSON K.-E., HOTZEL H., DILLER R., DE SANTIS P., BOTELHO A., AYLING R.D., NICHOLAS R.A.J., THIAUCOURT F. & SACHSE K. (2005). Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: A collaborative trial. *Vet. J.*, **169**, 268–275.
2. BASHIRUDDIN J.B., TAYLOR T.K. & GOULD A.R. (1994). A PCR-based test for the specific identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC in clinical material. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 428–434.
3. BERGONIER D., BERTHOLET X. & POUMARAT F. (1997). Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **16**, 848–873.
4. BOLSKE G., MSAMI H., HUMLESLO N.E., ERNO H. & JOHANSSON L. (1988). *Mycoplasma capricolum* in an outbreak of polyarthritis and pneumonia in goats. *Acta Vet. Scand.*, **29**, 331–338.

5. BRADBURY J.M. (1998). Identification of mycoplasmas by immunofluorescence. *In: Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J., eds. Humana Press, Totowa, USA, 119–125.
6. DA MASSA A.J., BROOKS D.L. & ADLER H.E. (1983). Caprine mycoplasmosis: widespread infection in goats with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large-colony type). *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 322–325.
7. DEDIEU L., MADY V. & LEFEVRE P. C. (1995). Development of two PCRs for the identification of mycoplasmas causing contagious agalactia. *FEMS Microbiol. Lett.*, **129**, 243–250.
8. GRECO G., CORRENTE M., BUONOVOLIA D., ALIBERTI A. & FASANELLA A. (2002). Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. *Microbiologica*, **25**, 17–20.
9. GRECO G., CORRENTE M., MARTELLA V., PRATELLI A. & BOUNOVOLIA D. (2001). A multiplex PCR for the diagnosis of contagious agalactia of sheep and goats. *Mol. Cell. Probes*, **15**, 21–25.
10. GIL M.C., HERMOSA DE MENDOZA M., REY J., ALONSO J.M. POVEDA J.B. & HERMOSA DE MENDOZA J. (1999). Aetiology of caprine contagious agalactia syndrome in Extramadura, Spain. *Vet. Rec.*, **144**, 24–25.
11. KHAN L., LORIA G., ABU-AMERO K., NICHOLAS R.A.J., HALABLAB M. & MILES R.J. (2001). Distinctive biochemical characteristics of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*. *In: Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 5, Poveda J.B., Fernandez A., Frey J. & Johansson K.-E., eds. European Commission, Brussels, Belgium, 60–63.
12. KHAN L.A., LORIA G.R., RAMIREZ A.S., NICHOLAS R.A.J., MILES R.J. & FIELDER M.D. (2004). Biochemical characterisation of some non fermenting, non arginine hydrolysing mycoplasmas of ruminants. *Vet. Microbiol.*, **109**, 129–134.
13. LAMBERT M., CALAMEL M., DU FOUR P., CABASSE E., VITU C. & PEPIN M. (1998). Detection of false-positive sera in contagious agalactia with a multiantigen ELISA and their elimination with a protein G conjugate. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 326–330.
14. LORIA G.R., SAMMARTINO C., NICHOLAS R.A.J. & AYLING R.D. (1999). *In vitro* susceptibility of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin-spectinomycin. *Res. Vet. Sci.*, **75**, 3–7.
15. MERCIER P., LENFANT D., POUMARAT F. & PERRIN G. (2001). Prevalence of mycoplasma infection within French milking caprine herds. *In: Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 5, Poveda J.B., Fernandez A., Frey J. & Johansson K.-E., eds. European Commission, Brussels, Belgium, 130–133.
16. MCAULIFFE L., ELLIS R., LAWES J., AYLING R.D. & NICHOLAS R.A.J. (2005). 16S rDNA and DGGE: a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J. Med. Microbiol.*, **54**, 1–9.
17. NICHOLAS R.A.J. (1998). Surveillance for contagious agalactia in Great Britain. *In: Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 2, Leori G., Santini F., Scanziani E. & Frey J., eds. European Commission, Brussels, Belgium, 95–97.
18. NICHOLAS R.A.J. (2002). Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Rumin. Res.*, **45**, 145–149.
19. NICHOLAS R.A.J. & BAKER S.E. (1998). Recovery of mycoplasmas from animals. *In: Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J. eds. Humana Press, Totowa, USA, 37–44.
20. PEYRAUD A., WOUBIT S., POVEDA J.B., DE LA FE C., MERCIER P. & THIAUCOURT F. (2003). A specific PCR for the detection of *Mycoplasma putrefaciens*, one of the agents of the contagious agalactia syndrome of goats. *Mol. Cell. Probes*, **17**, 289–294.
21. POUMARAT F. (1998). Identification of mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF Dot). *In: Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J., eds. Humana Press, Totowa, USA, 113–118.
22. POVEDA J.B. (1998). Biochemical characteristics in mycoplasma identification. *In: Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J., eds. Humana Press, Totowa, USA, 69–78.

23. POVEDA J.B. & NICHOLAS R.A.J. (1998). Serological identification of mycoplasmas by growth and metabolic inhibition tests. *In: Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J., eds. Humana Press, Totowa, USA, 105–111.
24. RAMIREZ A S., DE LA FE C., ASSUNCAO P., GONZALEZ M. & POVEDA J.B. (2001). Preparation and evaluation of an inactivated polyvalent vaccine against *Mycoplasma* spp on infected goats. *In: Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 5, Poveda J.B., Fernandez A., Frey J. & Johansson K.-E., eds. European Commission, Brussels, Belgium, 154–157.
25. RODRIGUEZ J.L., POVEDA J.B., GUTIERREZ C., ACOSTA B. & FERNANDEZ A. (1994). Polyarthrititis in kids associated with *Mycoplasma putrefaciens*. *Vet. Rec.*, **135**, 406–407.
26. SUBRAHAMANIAM S., BERGONIER D., POUMARAT F., CAPUAL S., SCHLATTER Y., NICOLET J. & FREY J. (1998). Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the uvrC gene by PCR. *Mol. Cell. Probes*, **12**, 161–169.
27. SUNDER J., SRIVASTAVA N.C. & SINGH V.P. (2002) Preliminary trials on development of vaccine against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* type LC infection in goats. *J. Appl. Anim. Res.*, **21**, 75–80.
28. TOLA S., ANGIOI A., ROCCHIGIANI A.M., IDINI G., MANUNTA D., GALLERI G. & LEORI G. (1997). Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, **54**, 17–22.
29. TOLA S., MANUNTA D., COCCO M., TURRININ F., ROCCHIGIANI A.M., IDINI G., ANGIOI A. & LEORI G. (1997). Characterisation of membrane surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. *FEMS Microbiol. Lett.*, **154**, 355–362.
30. TOLA S., MANUNTA D., ROCCA S., ROCCHIGIANI A.M., IDINI G., ANGIOI A. & LEORI G. (1999). Experimental vaccination of against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccine. *Vaccine*, **17**, 2764–2768.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour l'agalactie contagieuse (voir Tableau dans la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site web de l'OIE pour une liste actualise : www.oie.int).

PLEUROPNEUMONIE CONTAGIEUSE CAPRINE

RÉSUMÉ

La pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC) est une maladie grave des chèvres due à Mycoplasma capricolum subspecies capripneumoniae (Mccp). Cet organisme est très proche de 3 autres mycoplasmes : M. mycoides subsp. mycoides large colonies (LC), M. mycoides subsp. capri, et M. capricolum subsp. capricolum. Contrairement à la vraie PPCC, qui est limitée à la cavité thoracique, la maladie causée par les 3 autres mycoplasmes s'accompagne de lésions importantes dans d'autres organes (et/ou parties du corps), situés en dehors de la cavité thoracique.

Les formes typiques de PPCC sont caractérisées dans les troupeaux sensibles par une fièvre extrême (41 à 43 °C) et des taux de morbidité et de mortalité élevés, affectant des animaux de tous âges et des deux sexes. Les chèvres gestantes avortent. La PPCC semble être transmise par des aérosols infectieux. Après environ 2 à 3 jours de forte fièvre, les signes respiratoires apparaissent : la respiration est accélérée et douloureuse, et dans certains cas elle est accompagnée par un râle. La toux est fréquente, violente et productive. Au stade terminal, les animaux sont incapables de se déplacer – ils restent debout avec les antérieurs écartés, le cou raide et en extension, et parfois de la salive s'écoule de la bouche. L'examen post mortem révèle une pleuropneumonie fibrineuse avec une hépatisation massive du poumon et une pleurésie, associé à une accumulation de liquide pleural de couleur jaune paille.

Il a été démontré récemment que la maladie affectait les ruminants sauvages telles que les chèvres sauvages (Capra aegagru), le bouquetin d'Abyssinie (Capra ibex Nubian), le mouflon du Laristan (Ovis orientalis laristanica) et le Gerenuk (Litocranius waleri). La maladie clinique et la présence d'anticorps ont été signalées chez le mouton en contact avec des chèvres infectées, mais son rôle comme réservoir de l'infection n'est pas clair.

Identification de l'agent pathogène : *le diagnostic définitif nécessite la culture de l'agent causal à partir d'échantillons de tissu pulmonaire et/ou de liquide pleural prélevés après la mort. Après clonage et purification, les isolats peuvent être identifiés par plusieurs tests biochimiques, immunologiques et moléculaires. Récemment, un test basé sur une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) a été décrit et il s'est révélé spécifique, sensible et applicable directement sur des prélèvements cliniques, tels que du poumon ou du liquide pleural.*

Épreuves sérologiques : *des épreuves sérologiques ont été largement utilisées pour le diagnostic de foyers de PPCC en Érythrée et en Turquie. Ces épreuves sont utilisées à l'échelle du troupeau plutôt que pour un diagnostic individuel. La fixation du complément reste l'épreuve sérologique la plus utilisée pour la PPCC, bien que le test d'agglutination au latex soit de plus en plus utilisé au laboratoire ou sur le terrain ; il peut être utilisé aussi bien sur sang total que sur sérum. L'hémagglutination indirecte est également pratiquée. Une méthode immuno-enzymatique (ELISA) de compétition a été développée mais n'est pas largement disponible. Comme les autres épreuves sérologiques, elle ne détecte pas tous les positifs, mais sa spécificité et sa facilité d'emploi pour des tests à grande échelle la rendent intéressante pour des enquêtes épidémiologiques.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *un vaccin contre la PPCC causée par Mccp est disponible dans le commerce.*

A. INTRODUCTION

La pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC) est une maladie grave des chèvres qui se manifeste dans beaucoup de pays en Afrique et en Asie où la population caprine totale dépasse 500 millions de têtes (1). La première description de la maladie remonte à 1873 en Algérie. Peu de temps après, en 1881, la maladie a été introduite dans la « colonie du Cap » en Afrique du Sud par une cargaison de chèvres Angora (15, 16). Elle fut éradiquée par une politique d'abattage des chèvres infectées associée à des opérations de vaccination chez les chèvres en contact. Classiquement, la forme aiguë de PPCC est due à *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*) (23), connue originellement comme le biotype F38. C'est au Kenya que cet organisme a été isolé pour la première fois et reconnu comme responsable de la PPCC (24-27) ; par la suite, il a été isolé au Soudan, en Tunisie, à Oman, en Turquie, au Tchad, en Ouganda, en Éthiopie, au Niger, en Tanzanie, en Érythrée et aux Émirats Arabes Unis. La CCPP a été signalée pour la première fois en Europe en 2004, quand des foyers ont été confirmés en Thrace (Turquie), avec des pertes, dans certains troupeaux, de plus de 25 % chez les chevreaux et les adultes (35). Néanmoins, sa répartition exacte est inconnue, et elle pourrait être beaucoup plus répandue que dans la seule zone représentée par les pays où *Mccp* a été isolé car la PPCC est souvent confondue avec d'autres affections respiratoires et parce que l'isolement de l'agent causal est particulièrement difficile.

Lors de foyers dans des troupeaux où chèvres et moutons sont mélangés, ces derniers peuvent aussi être affectés comme cela a été vérifié par l'isolement de *Mccp* (5) ou la détection d'anticorps spécifiques chez des moutons cliniquement malades (19). *Mccp* a aussi été isolé de moutons sains (21), et le rôle du mouton comme réservoir de la maladie doit être envisagé.

Récemment, la PPCC a été confirmée chez les ruminants sauvages dans une réserve de conservation de la faune sauvage au Qatar. La maladie a touché des chèvres sauvages (*Capra aegagrus*), le bouquetin d'Abyssinie (*Capra ibex Nubian*), le mouflon du Laristan (*Ovis orientalis laristanica*) et le Gerenuk (*Litocranius waleri*) avec une morbidité et une mortalité significatives dans ces espèces (2). Une maladie que l'on ne peut distinguer de la PPCC naturelle a été reproduite expérimentalement avec *Mccp* par plusieurs groupes de chercheurs.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Le diagnostic des troubles respiratoires des caprins, et en particulier de la PPCC, est difficile, particulièrement pour les formes enzootiques. Il faut la distinguer des autres syndromes similaires au plan clinique et pathologique : la peste des petits ruminants, à laquelle les ovins sont également sensibles ; la pasteurellose, qui peut être distinguée sur la base de la distribution des lésions pulmonaires ; et ce que l'on appelle le syndrome « mammite, arthrite, kératite, pneumonie et septicémie » (MAKePS) ou plus souvent le syndrome agalactie contagieuse (47). Comme le laisse suggérer le nom du syndrome, la pneumonie est associée à des lésions importantes dans d'autres organes. La maladie causée par *Mccp* est contagieuse et mortelle pour les chèvres sensibles, quelque soit l'âge et le sexe ; elle n'atteint que rarement les ovins et n'affecte pas les bovins.

1. Identification de l'agent pathogène

a) Examen microscopique des exsudats, des frottis et des coupes pulmonaires

La PPCC est caractérisée au plan histopathologique par une pneumonie interstitielle avec de l'œdème intralobulaire et interstitiel des poumons (18, 34). *Mccp* présente *in vivo* une morphologie filamenteuse ramifiée qui peut être observée au microscope à fond noir à partir des exsudats ou de suspensions tissulaires obtenues à partir de lésions ou de liquide pleural. Des frottis peuvent également être réalisés à partir des lésions pulmonaires et, après coloration de May-Grünwald-Giesma, être examinés au microscope optique. Les autres mycoplasmes caprins apparaissent sous forme de courts filaments ou de coccobacilles. Aucune de ces techniques ne fournit un diagnostic définitif.

b) Méthodes de reconnaissance de l'acide nucléique

Deux épreuves d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) pour l'identification spécifique de *Mccp* ont été publiées. La première (3) est basée sur l'amplification du gène de l'ARNr 16S du groupe mycoides. Le produit de la PCR est ensuite fragmenté par des enzymes de restriction pour identifier l'amplimère de *Mccp*. La seconde épreuve (50) est basée sur une amplification spécifique. Ces tests peuvent être utilisés directement sur des échantillons cliniques tels que du tissu pulmonaire ou du liquide pleural (6). Du fait des difficultés lors de l'isolement de *Mccp*, la PCR est une technique de choix pour le diagnostic de la PPCC. Cependant, seul l'isolement de *Mccp* constitue le test de confirmation. Grâce au typage d'une séquence polymorphe, il est possible d'attribuer à tous les mycoplasmes du groupe mycoides une place phylogénétique précise, ce qui peut être utilisé à des fins d'identification (30).

c) Tests de précipitation en gel (pour détecter les antigènes dans les tissus)

Mccp libère un antigène polysaccharidique (41) pour lequel un anticorps monoclonal spécifique (AcM) (WM-25) a été produit (42, 43). Cet anticorps monoclonal forme, en gel d'agar, un précipité avec le polysaccharide produit par *Mccp*, et est utilisé pour identifier l'agent causal de la PPCC, en particulier quand les prélèvements ne permettent pas la culture, suite à une détérioration pendant le transport.

d) Isolement des mycoplasmes

i) Choix des prélèvements

Les prélèvements *post mortem* de choix sont les lésions pulmonaires, en particulier à la limite entre les zones lésées et les zones non lésées, le liquide pleural et les nœuds lymphatiques médiastinaux. Si l'examen microbiologique ne peut pas être pratiqué immédiatement, les échantillons ou le poumon entier, peuvent être conservés à -20°C pendant de longues périodes (plusieurs mois) avec peu d'effet sur la viabilité des mycoplasmes. Pendant le transport, les prélèvements doivent autant que possible être conservés au froid car la viabilité des mycoplasmes diminue rapidement quand la température augmente. Les prélèvements de poumon peuvent être expédiés à d'autres laboratoires sous forme congelée.

ii) Traitement des prélèvements

Les écouvillons sont mis en suspension dans 2 à 3 ml de milieu de culture. Les prélèvements de tissu sont émincés avec des ciseaux, puis agités vigoureusement ou broyés dans du milieu¹ en plaçant 1 g de tissu dans 9 ml de milieu. Les tissus ne doivent pas être écrasés. La suspension est généralement préparée dans un milieu pour mycoplasmes, mais si un examen bactériologique doit être mené en parallèle, il vaut mieux utiliser un milieu de haute qualité bactériologique tel qu'un bouillon nutritif qui permet les deux types d'analyses. Le prélèvement (liquide pleural ou suspension tissulaire ou écouvillon) est dilué (au moins 3 dilutions décimales, jusqu'à 10^{-4}) dans du milieu mycoplasme. Des dilutions doivent également être réalisées en milieu solide.

iii) Milieux pour mycoplasmes

Le milieu utilisé par MacOwan et Minette pour cultiver *Mccp* (25), encore appelé « viande foie goat » (VFG), contient un bouillon « viande foie » de chèvre et du sérum de chèvre. Les autres milieux sont WJ (17), le milieu de Hayflick modifié et le milieu tryptose modifié de Newing (19). Un milieu enrichi avec 0,2 % (ou jusqu'à 0,8 %) de pyruvate de sodium améliore considérablement les résultats, tant pour l'isolement primaire que pour la production d'antigène de *Mccp* (31, 32). Des exemples de milieux sont donnés ci-dessous (6, 47, 49).

• Milieu PPCC (de Thiaucourt)

A. *Partie autoclavée* (121°C pendant 15 min) : bouillon Bacto PPLO (pleuropneumonia-like organisms) sans violet cristal (Difco) (21 g) ; eau déminéralisée (700 ml).

B. *Partie filtrée sur membrane* : sérum de cheval (éventuellement de porc ou d'âne) inactivé à 56°C pendant 30 min (200 ml) ; extrait frais de levure (100 ml) ; glucose (solution stérile 0,5 g/ml) (2 ml) ; et pyruvate de sodium (solution stérile 0,5 g/ml) (8 ml).

La partie B est ajoutée à A aseptiquement. De l'ampicilline (0,1 g/litre) et de l'acétate de thallium (250 mg/litre) peuvent être ajoutés pour éviter les contaminations lors des premiers isollements. Le pH final du milieu doit être de 7,4 à 7,6.

• Milieu PPCC (de Thiaucourt) modifié

A. *Partie autoclavée* (121°C pendant 15 min) : bouillon Bacto PPLO sans violet cristal (Difco) (17,5 g) ; eau distillée (650 ml).

B. *Partie filtrée sur membrane* : sérum de cheval (éventuellement de porc ou d'âne) inactivé à 56°C pendant 30 min (250 ml) ; extrait frais de levure (100 ml) ; 50 % de glucose (4 ml) ; 25 % de pyruvate de sodium (8 ml) ; 5 % d'acétate de thallium (4 ml) ; de l'ampicilline (250 mg) ; et 0,5 % de rouge phénol (4 ml). Le pH est ajusté à 7,8 avec de l'hydroxyde de sodium ou de l'acide chlorhydrique. La partie B est ajoutée à A de façon stérile.

Le bouillon tryptose modifié de Newing (19) et des boîtes de gélose (milieu de Gourlay) (11) sont utilisés en routine pour l'isolement et la conservation de *Mccp* au Laboratoire de référence de l'OIE au Kenya (se reporter à la liste de la Partie 3 de ce *Manuel terrestre*).

¹ Par exemple avec le Stomacher 80, A.J. Seward, Londres, Royaume-Uni.

iv) *Production, stockage et contrôle de qualité des milieux*

Les propriétés de certains composants du milieu, en particulier le sérum, l'extrait de levure et l'eau déminéralisée, doivent être contrôlées régulièrement avant leur incorporation dans le milieu pour mycoplasmes. Pour cela, on cultivera des isolats de terrain ayant été peu multipliés.

Les bouillons peuvent être conservés avant utilisation pendant au moins 6 mois à -25°C , mais la pénicilline ou ses analogues doivent être ajoutés au dernier moment. Le bouillon est réparti dans des tubes Eppendorf (1,8 ml ou 2,7 ml) ou dans des tubes avec des bouchons à vis (4,5 ml), et stocké à 4°C pendant 3 semaines maximum. Pour les milieux solides, on peut utiliser de l'agarose (0,9 % [p/v]), de l'agar Noble (1,5 % [p/v]), ou de l'agar purifié (0,6 % [p/v]). Les boîtes, remplies jusqu'à une hauteur de 6 à 8 mm, doivent être utilisées dès que possible et ne peuvent pas être conservées plus de 2 semaines à 4°C avant utilisation. Tous les milieux de culture doivent faire l'objet de contrôles de qualité et doivent être capable d'assurer la croissance de *Mycoplasma* spp. à partir de faibles inoculums. La souche de référence doit être ensemencée en même temps que les prélèvements suspects pour contrôler le bon déroulement de l'analyse.

v) *Culture*

Les cultures sont incubées à 37°C . Les boîtes sont incubées en atmosphère humide avec 5 % de CO_2 , 95 % d'air ou N_2 , ou dans une jarre à anaérobiose avec une source d'humidité.

Les cultures en bouillon sont examinées tous les jours pour mise en évidence de la croissance (changement de couleur et trouble). Une turbidité importante traduit une contamination bactérienne ; les cultures doivent alors être filtrées (à travers une membrane de $0,45\ \mu\text{m}$) avant d'être repiquées. Les cultures en bouillon sont repiquées en milieu liquide (au $1/10^6$) ou en milieu solide (avec une anse).

Les cultures en boîtes sont examinées tous les 1 à 3 jours avec un microscope binoculaire (grossissement $\times 5$ à 50) et sous lumière transmise incidente. Si le résultat est négatif, les boîtes sont éliminées au bout de 14 jours. En cas de résultat positif, un repiquage est réalisé à partir d'un bloc d'agar contenant les colonies, soit en milieu solide (sur lequel le bloc d'agar est déposé, face vers le bas), soit en milieu liquide. On peut également prélever une colonie avec une pipette Pasteur et inoculer un nouveau bouillon.

Le clonage et la purification des isolats sont réalisés en répétant les repiquages de chaque colonie présentant des aspects morphologiques différents. La morphologie d'une colonie varie selon le milieu utilisé, l'espèce de mycoplasme, le nombre de passages et l'âge de la culture.

Au cours des premiers passages, plusieurs espèces de mycoplasmes, y compris *M. capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*), produisent des colonies avec une morphologie bizarre, souvent petites, sans centre, et de forme irrégulière. Cet effet est souvent associé à l'utilisation de milieux faiblement adaptés. Au bout de plusieurs passages, ces isolats présentent une morphologie typique « en œuf sur le plat », sauf *M. ovipneumoniae*, qui conserve des colonies sans centre. Les colonies de *M. mycoides* subsp. *mycoides* Large Colony (*Mmm* LC) et *Mcc* peuvent atteindre 3 mm de diamètre.

La filtration des cultures en bouillon à travers une membrane de $0,45\ \mu\text{m}$ avant le repiquage facilite la purification en éliminant les agrégats cellulaires.

Les cultures suspectes d'être des bactéries en phase L doivent être repiquées 3 à 5 fois sur un milieu mycoplasme solide sans antibiotiques, ni acétate de thallium, pour favoriser le retour à la forme bactérienne.

Les bouillons utilisés pour le premier isolement et dans lesquels aucune croissance n'a été mise en évidence au bout de 7 jours doivent être repiqués en aveugle.

Les cultures de chaque échantillon, incluant les repiquages en aveugle, doivent être examinées pendant au moins 3 semaines avant d'être éliminées. Les dilutions en bouillon, si elles ont été réalisées complètement (jusqu'à 10^{-10}), sont également lues au bout de 3 à 4 semaines et sont exprimées en unité provoquant un changement de couleur par volume transféré. La croissance sur boîte est exprimée en Unité Formant Colonie (UFC) par ml.

e) *Identification des mycoplasmes*i) *Amplification en chaîne par polymérase (PCR)*

Une fois que l'organisme est isolé, l'identification de *Mccp* peut être obtenue en 1 jour par PCR. Il existe de nos jours plusieurs tests PCR qui peuvent être utilisés pour l'identification des souches de *Mccp*. Le premier test (3) est basé sur l'amplification d'un segment du gène de l'ARNr 16S. Le fragment amplifié appartient au groupe mycoïdes. Mais après digestion de l'amplimère par l'endonuclease *Pst*I, et analyse des produits de la digestion par électrophorèse en gel d'agarose et marquage au bromure d'éthidium (6). Le second test est basé sur une amplification spécifique et permet la confirmation du diagnostic de PPCC en quelques heures (50).

Récemment, la PCR et le séquençage ont été utilisés pour décrire l'épidémiologie moléculaire de la PPCC. Ces tests peuvent être réalisés sur des prélèvements déshydratés, tel que du liquide pleural sur papier filtre. Le séquençage permet une identification précise de l'espèce (le site de clivage pour l'ARNr 16S et une détection spécifique du « locus H2 ») (22, 37).

L'identification des souches de *Mccp* par PCR (et le séquençage) a surpassé, de nos jours, toutes les autres techniques en raison de sa rapidité et de sa fiabilité. Néanmoins, les épreuves de PCR doivent être conduites avec soin pour éviter les contaminations.

ii) Tests biochimiques

Les souches sauvages doivent être repiquées, et de préférences clonées, 3 fois avant l'identification.

Contrairement aux méthodes sérologiques ou génétiques, les tests biochimiques ne permettent pas une identification précise. En effet, certaines réactions biochimiques présentent parfois des variations intraspécifiques importantes (13), mais ces tests sont néanmoins utiles car ils permettent un dépistage préliminaire et fournissent des éléments pour les épreuves sérologiques.

Les tests les plus utilisés sont la fermentation du glucose, l'hydrolyse de l'arginine, la formation de « films and spots », la réduction du chlorure de tétrazolium (en aérobose et en anaérobose), l'activité de la phosphatase, la digestion du sérum et la sensibilité à la digitonine. Les 3 premiers sont utilisés en routine pour l'isolement et la culture. En utilisant du rouge phénol comme indicateur dans le bouillon, l'utilisation du glucose se traduit par un changement acide (jaune) alors que l'hydrolyse de l'arginine se manifeste par un changement basique (rouge). L'utilisation de l'arginine ne peut pas être appréciée sur les milieux conventionnels pour l'isolement et la culture parce que les milieux permettant de mettre en évidence l'arginine décarboxylase doivent contenir des concentrations élevées en arginine et pas de glucose. La réaction « Film and spots » décrit un plissement apparent de la surface de la gélose dû au dépôt d'un film lipidique, associé au développement de taches noires dans le milieu à proximité des colonies vieillissantes. Ce phénomène, produit par 3 mycoplasmes des petits ruminants, est mis en évidence sur des géloses contenant plus de 20 % de sérum, de préférence de cheval ou de porc. La supplémentation du milieu avec 10 % d'une émulsion de jaune d'œuf améliore la sensibilité du test.

Les autres tests biochimiques nécessitent des milieux ou des réactifs spécifiques. Le test de réduction du chlorure de tétrazolium fournit une preuve de la nature mycoplasmaïque des isolats de *M. agalactiae*, puisque cet organisme n'est ni glucolytique, ni capable d'hydrolyser l'arginine. La digestion du sérum (9) permet de distinguer les mycoplasmes des ruminants, et la production de phosphatase (7) sépare *Mcc* des autres membres de ce groupe. La sensibilité à la digitonine différencie les membres de l'ordre des Mycoplasmatales de ceux de l'ordre des Acholeplasmatales (10). Un milieu de diagnostic est disponible qui permet la détection spécifique des souches de *Mccp* qui cultivent sur milieu gélosé : les colonies apparaissent rouges (35).

iii) Identification sérologique

Les antigènes mycoplasmaïques utilisés pour la production de sérums hyperimmuns sont souvent contaminés par des constituants du milieu. Les anticorps produits contre ces contaminants peuvent induire des réactions faussement positives lors des épreuves sérologiques d'identification. Ce problème est évité en adsorbant l'antisérum avec le milieu utilisé pour produire l'antigène (10 mg de milieu lyophilisé par ml d'antisérum), ou en cultivant les mycoplasmes utilisés comme antigènes dans du milieu contenant des composants homologues, par exemple croissance dans du milieu VFG pour immuniser des chèvres.

Du fait de relations sérologiques proches entre les membres du « groupe *M. mycoides* », les isolats issus de cas de PPCC doivent, de préférence, être identifiés par au moins deux des trois tests décrits ci-dessous.

• Test d'inhibition de croissance

Le test d'inhibition de croissance (GIT) est le plus simple, le plus spécifique mais le moins sensible des tests disponibles. Il dépend de l'inhibition directe de la croissance en milieu solide par des sérums hyperimmuns, et détecte principalement des antigènes de surface (8).

Mccp apparaît très homogène sérologiquement et de grandes zones d'inhibition, indemnes de toute colonie, sont observées avec un antisérum contre la souche de référence, indépendamment de l'origine de la souche testée (17). En inhibition de croissance, *Mccp* croise avec la souche bovine du groupe 7 de Leach (PG50), *M. equigenitalium* et *M. primatum* quand des sérums polyclonaux sont utilisés, mais un anticorps monoclonal spécifique de *Mccp* en inhibition de croissance a été produit (42). Le réactif monoclonal, WM25, est considéré comme spécifique (*Mccp*) pour la méthode d'inhibition de croissance, ce qui permet d'exclure *M. agalactiae*, *Mcc* et les autres membres du « groupe *M. mycoides* » rencontrés chez les caprins, mais pas

« la souche bovine du groupe 7 de Leach » (pas isolé sur chèvre) : cependant, cette dernière peut être exclue par des épreuves d'immunofluorescence indirecte sur colonie (4). Une faible proportion d'isolats de *Mccp* peuvent également croiser en inhibition de croissance avec un antisérum pour *Mcc*. Les souches « groupe 7 de Leach » peuvent parfois être isolées sur des chèvres bien que cela soit rare. Les résultats de l'inhibition de croissance doivent être interprétés avec précaution car certaines souches bovines n'ont pas été correctement identifiées, même en utilisant des sérums « spécifiques ».

- **Protocole**

- Une culture en bouillon, en seconde partie de phase logarithmique, est utilisée avec 3 dilutions décimales, la sélection de la dilution s'effectue en fonction de la vigueur de la croissance en gélose.
- Les boîtes de gélose sont séchées pendant 30 min à 37 °C.
- Des disques de papier stériles de 6 à 7 mm de diamètre sont imprégnés avec une goutte (10 à 20 µl) d'antisérum non dilué. Les disques peuvent être utilisés humides, ce qui implique une conservation à -20 °C, ou ils peuvent être lyophilisés (8), ce qui permet un stockage à 4 °C.
- En utilisant une boîte différente pour chaque dilution de la culture, des boîtes de respectivement 5 cm ou 10 cm de diamètre sont inondées avec des volumes de 1 ou 2,5 ml. L'inoculum est réparti de façon homogène dans la boîte et l'excédent est enlevé.
- Les boîtes sont séchées entre 20 et 30 °C pendant 15 à 20 min, de préférence sous une hotte, jusqu'à disparition du liquide en surface. Une humidité résiduelle suffisante est nécessaire pour permettre l'adhérence des disques à la surface de la gélose.
- Plusieurs disques, imprégnés chacun avec un antisérum différent (sélectionnés sur la base de l'origine du prélèvement et des réactions biochimiques et de la morphologie de la colonie), sont déposés délicatement sur la gélose ; les isolats provenant de cas de PPCC doivent être testés avec des antisérums contre *Mccp*, *MmmLC*, *Mcc*, *M. mycoides* subsp. *capri* (*Mcc*) et *M. ovipneumoniae*. Un disque contenant 1,5 % de digitonine doit également être déposé sur les boîtes.
- Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 2 à 6 jours. Une incubation initiale pendant une nuit à 27 °C peut augmenter la sensibilité du test. L'inhibition par la digitonine est généralement apparente ; cependant, l'inhibition par l'antisérum peut être plus difficile à interpréter, avec un arrêt de la croissance plutôt qu'une inhibition totale. Cela dépend de l'espèce de mycoplasme, de la densité de la colonie et de la force de l'antisérum. Des colonies sont couramment observées à l'intérieur des zones d'inhibition. Des anneaux de précipitation sont parfois observés autour des disques. La réaction est considérée comme positive si la zone d'inhibition est supérieure à 2 mm.

- **Test de précipitation de la croissance**

Le test de précipitation de la croissance détecte des antigènes solubles, cytoplasmiques et extra-membranaires, libérés par des cultures en croissance et qui ont la capacité de diffuser vers les antisérums à travers le milieu solide (20). Comme pour le test de précipitation en gel, on observe des réactions croisées importantes au sein du « groupe mycoides ». Si l'inhibition de croissance utilise l'anticorps monoclonal WM25², qui est spécifique de *Mccp*, on observe simultanément une inhibition spécifique et une ligne de précipité.

- **Épreuve d'immunofluorescence indirecte**

Parmi les différentes méthodes sérologiques, les épreuves d'immunofluorescence directe et indirecte sont les épreuves les plus efficaces pour l'identification de la plupart des mycoplasmes (38). Elles sont simples, rapides, sensibles et pourtant économiques dans l'utilisation de l'antisérum. Plusieurs variantes ont été décrites, la plus couramment utilisée, et probablement la meilleure, étant l'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) appliquée sur des colonies sur gélose et non fixées. Un antisérum contre une souche pure est suffisant pour identifier les isolats de terrain de cette espèce, et les antisérums sont dilués avant utilisation. Les cultures n'ont pas besoin d'être clonées, mais l'épreuve est habituellement appliquée après plusieurs passages. Ceux-ci permettent de vérifier si la culture contient plusieurs espèces, et d'établir les caractéristiques de croissance du (des) organisme(s).

2 Disponible auprès du Kenya Agricultural Research Institute (KARI), P.O. Box 57811, Nairobi, Kenya.

• **Protocole**

- i) Deux boîtes sont séchées à 37 °C pendant 30 min. Chaque boîte est inondée avec une dilution différente de la culture en milieu liquide, les dilutions étant choisies en fonction de la vigueur de la croissance de la souche en milieu solide. Par ailleurs, une goutte de la culture non diluée est étalée sur une boîte de 5 cm en utilisant une pipette coudée.
- ii) Les boîtes sont incubées à 37 °C jusqu'à apparition de la croissance. Si l'épreuve d'IFI ne peut pas être réalisée immédiatement, les boîtes peuvent être conservées à 4 °C pendant 4 semaines.
- iii) Plusieurs blocs d'approximativement 0,5 à 1 cm² sont découpés dans les zones où les colonies sont nombreuses mais non confluentes. Pour permettre de reconnaître l'origine des souches, les blocs de chaque culture seront découpés avec la même forme (avec une forme différente pour chaque isolat). Plusieurs blocs de chaque isolat sont répartis sur plusieurs lames (la surface de la colonie vers le haut), chaque lame correspondant à un antisérum. La surface de la colonie de chaque bloc est identifiée en découpant un coin.
- iv) Un sérum de lapin anti-mycoplasme (ra-m) ou un sérum de lapin normal (NRS; utilisé comme témoin sur 2 blocs) dilué dans une solution physiologique normale ou une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,2, est délicatement distribué sur chaque bloc de gélose de façon à recouvrir toute la surface. La dilution optimale du sérum ra-m est déterminée par titrage en échiquier réalisé avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) – un sérum conjugué anti-immunoglobuline de lapin étant utilisé (a-r Ig-FITC).
- v) Les blocs inondés sont incubés sur les lames à température ambiante pendant 30 min dans une enceinte humide.
- vi) Tous les blocs d'une même lame sont transférés dans un tube de 10 ml contenant approximativement 7 ml de PBS.
- vii) Les tubes sont centrifugés à 18-30 tr/min pendant 10 min. Puis le PBS est éliminé, remplacé par du nouveau PBS et les tubes sont centrifugés à nouveau pendant 10 min.
- viii) Le PBS est enlevé et les blocs sont replacés sur leurs lames (surface de la colonie vers le haut). L'excès d'humidité est séché.
- ix) Tous les blocs sont recouverts avec le sérum a-r Ig-FITC à la dilution optimale.
- x) Les blocs sont de nouveau incubés pendant 30 min à température ambiante dans une enceinte humide, puis glissés dans des tubes contenant du PBS, et lavés 2 fois avec centrifugation comme précédemment.
- xi) Les blocs, replacés sur leurs lames, la surface de la colonie vers le haut, sont examinés avec un microscope à épi-immunofluorescence, selon les indications du fabricant pour FITC.

• **Notes pour l'épreuve d'immunofluorescence indirecte**

- xii) Les dilutions de travail des sérums ra-m et a-r Ig-FITC doivent être conservées à 4 °C, ce qui limite leur durée de vie à environ 1 semaine.
- xiii) Les isolats de PPCC doivent être examinés avec les antisérums de *Mccp*, *MmmLC*, *Mmc* (*M. mycoides* subsp. *capri*) et *Mcc*, les cultures utilisées comme témoin positif doivent comprendre les souches types, dénommées respectivement *Mccp*, Y goat, PG3 et California kid.
- xiv) Un témoin négatif (sérum NRS-traité) doit être incorporé à chaque culture.
- xv) L'interprétation de l'épreuve d'IFI peut être difficile. Une autofluorescence est produite par certaines espèces, particulièrement les acholéplasmes. Même en culture pure, une certaine proportion de colonies ne réagit pas avec l'antisérum correspondant ; cela est particulièrement vrai pour *Mcc*. Par ailleurs, des résultats faibles peuvent être attribués à des cultures trop âgées ou à des antisérums trop dilués ou trop vieux.

f) Autres épreuves d'identification

L'inhibition du métabolisme (46) et de la réduction du tétrazolium (44) sont d'autres tests utilisés parfois pour l'identification des mycoplasmes caprins. Une sonde génétique, F38-12, capable de reconnaître *Mccp* a été développée (45).

Un test d'agglutination au latex reposant sur la détection d'un antigène polysaccharidique spécifique a été développé pour détecter l'antigène de la PPCC (29). Dans ce test, des billes de latex sont recouvertes par des IgG polyclonales (lapin) dirigées contre le polysaccharide de *Mccp* et sont utilisées pour détecter

l'antigène dans le sérum de chèvres atteintes de PPCC. Ce test est considéré comme peu coûteux, facile à réaliser sur le terrain et utile pour détecter les stades précoces de PPCC.

2. Épreuves sérologiques

La sérologie n'est pas largement appliquée pour identifier les causes de pleuropneumonie chez les ovins et les caprins. Des infections enzootiques avec *Mmm*LC et *Mmc* peuvent induire un bruit de fond sérologique chez certains animaux apparemment sains (17), et dans des conditions expérimentales, une séroconversion vis-à-vis de *M. mycoides* peut survenir chez des chèvres sans signes cliniques. Les formes aiguës provoquées par *Mccp* induisent rarement des titres positifs avant la mort (27, 33, 47), peut-être parce que les anticorps sont masqués par les antigènes mycoplasmaux circulants (33). Chez des animaux infectés expérimentalement, une séroconversion vis-à-vis de *Mccp* est observée, avec le test de fixation du complément (FC) et le test d'hémagglutination indirecte (HAI). Elle débute 7 à 9 jours après l'apparition des signes cliniques, atteint un pic entre 22 et 30 jours, et décline rapidement (33). Ces diverses observations indiquent que la sérologie doit être appliquée à l'échelle du troupeau et non au niveau individuel, et que, quand cela est possible, il faut examiner des séries de sérums prélevés à 3-8 semaines d'intervalle.

a) Test de fixation du complément (épreuve prescrite pour les échanges internationaux) (25)

Le test de FC (avec ses différentes formes) demeure l'épreuve sérologique la plus largement utilisée pour le diagnostic de la pleuropneumonie contagieuse bovine (12, 36). Pour la PPCC, le test de FC est utilisé pour la détection de l'infection par *Mccp* (25) et il est plus spécifique et moins sensible que le test d'HAI (33). Mais la réalisation de ce test nécessite un niveau technique élevé, ce qui constitue son principal inconvénient (12).

On peut réaliser ce test de la façon suivante. La préparation de l'antigène nécessite 2 litres de culture avec un titre supérieur à 10^9 UFC/ml qui sont centrifugés à 40 000 *g* pendant 1 h à 5 °C. Le culot est remis en suspension et lavé 3 fois dans du sérum physiologique avant d'être conservé dans des volumes de 0,5 à 1,0 ml à -20 °C.

Un bouillon stérile traité comme indiqué précédemment constitue l'antigène témoin, et un bouillon lyophilisé reconstitué à 200 mg/ml constitue un second antigène témoin. Avant la réaction, l'antigène est dilué au 1/60 et subi un traitement aux ultra-sons à faible puissance pendant 3 min dans un conteneur d'eau glacée. Le produit est centrifugé à 1 250 *g* pendant 30 min pour éliminer les débris, puis conservé à -20 °C. Pour un stockage supérieur à 2-3 semaines l'antigène doit être centrifugé à nouveau.

• Protocole

Les tests sont réalisés dans des microplaques avec des puits en U avec des volumes de 0,025 ml de sérums, 2 volumes contenant le complément (3 doses hémolytiques moyennes), et des globules rouges de mouton (SRBC) à la concentration finale de 0,5 % (v/v) de la façon suivante :

- i) agitation et incubation à 37 °C pendant 45 min pour les éléments suivants :
 - 25 µl de dilutions de 2 en 2 du sérum à tester (inactivé par la chaleur à 56 °C pendant 30 min) en commençant par la dilution 1/2 ;
 - 25 µl de l'antigène (la dilution de l'antigène doit être déterminée en utilisant la technique de titration en échiquier avec un sérum positif connu) ;
 - 25 µl de complément (3 unités hémolytiques) ;
- ii) 25 µl de globules rouges de moutons sensibilisés (SRBC), à la concentration finale de 1,5 % (v/v). Agiter et incubé à 37 °C pendant 45 min ;
- iii) les plaques sont incubées à 4 °C pendant 1 h pour faire sédimenter les cellules non lysées ;
- iv) lecture des résultats : le titre est la plus forte dilution du sérum qui fixe 50 % du complément c'est-à-dire qui hémolyse à 50 %.

• Témoins

Un certain nombre de témoins sont nécessaires pour tous les tests de fixation du complément :

- i) systèmes indicateurs (GR + hémolysine), pour vérifier que la lyse des globules rouges (GR) n'a pas lieu spontanément ;
- ii) système indicateur + complément, pour vérifier qu'il y a assez de complément pour lyser les cellules ;

- iii) système indicateur + antigène, pour vérifier que l'antigène seul ne peut pas lyser les cellules ;
- iv) système indicateur + sérum, pour vérifier que le sérum seul ne peut pas lyser les cellules ;
- v) système indicateur + complément + antigène, pour détecter une activité anti-complémentaire de l'antigène ;
- vi) système indicateur + complément + sérum, pour détecter une activité anti-complémentaire du sérum.

b) Test d'agglutination au latex

Des billes de latex sensibilisées avec le polysaccharide produit par *Mccp* et présent dans le surnageant de culture ont été utilisées pour un test d'agglutination sur lame (14, 39). Ce test est actuellement mis en œuvre en routine au Kenya. Il est très utile en cas d'épizootie car il peut être appliqué sur le terrain à partir d'une goutte de sang.

Les deux tests, le test de FC et le test d'HAI, mettent en évidence les difficultés inhérentes au diagnostic sérologique de la PPCC quand on utilise une cellule entière ou des préparations membranaires comme antigènes. L'utilisation d'antigènes mieux définis, tels que le polysaccharide élaboré par *Mccp*, améliore la spécificité, puisqu'il n'y a pas de réactions croisées avec les 3 autres mycoplasmes.

c) Méthode immuno-enzymatique de compétition

Un test ELISA de compétition a été mis au point (48) et s'est révélé à la fois sensible et spécifique. Cependant, du fait de la faible demande, la production a été arrêtée jusqu'à ce qu'un nouveau système soit développé pour assurer une meilleure stabilité des réactifs.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Le premier vaccin expérimental contre *Mccp* comprenait une souche vivante multipliée plusieurs fois (28). Après inoculation intratrachéale, il a été démontré que ce vaccin avait une bonne innocuité et protégeait les chèvres lors d'une infection expérimentale. Cependant, les derniers travaux ont porté sur des vaccins inactivés. La forme actuellement utilisée au Kenya (où les vaccins inactivés sont utilisés depuis plusieurs années) contient une souche de *Mccp* inactivée en suspension dans la saponine ; cette formulation a une durée de conservation d'au moins 14 mois. La dose optimale qui assure une protection de plus de 1 an est de 0,15 mg de mycoplasme (40).

1. Gestion de la semence

a) Caractéristiques de la semence

Le lot de semence primaire a été isolé du poumon d'une chèvre malade. Au Kenya, la souche utilisée est appelée « Yatta » et a été confirmée comme *Mccp* par GIT et par PCR, après 15 passages en culture. La semence primaire doit également être pure et indemne de contaminants.

b) Méthode de culture

La semence primaire est produite et conservée sous forme lyophilisée dans des ampoules de 1 ml. La semence de travail est préparée en multipliant la semence primaire dans du bouillon Newing modifié pour obtenir un volume de 4 litres. La croissance est arrêtée pendant la phase de croissance, avant la formation de filaments.

La stérilité est contrôlée puis la culture est répartie en fractions aliquotes de 20 ml et conservée à –20 °C.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

La semence primaire doit être obtenue à partir d'échantillons de poumon ou de liquide pleural d'une chèvre morte de pneumonie et présentant tous les signes cliniques de la PPCC. Il faut confirmer par GIT ou par PCR qu'il s'agit bien de *Mccp*. Il faut contrôler la stérilité, l'innocuité, l'activité et l'absence d'agents étrangers.

2. Méthode de fabrication

Pour la production de vaccin, une semence de travail est préparée en multipliant une fraction aliquote de la semence primaire lyophilisée dans du bouillon Newing modifié (19) pour obtenir un volume de 4 litres de culture. Cette culture est répartie en aliquots de 20 ml et conservée à -20°C . La souche se multiplie dans des flacons de 5 litres contenant 4 litres de bouillon Newing modifié. La stérilité de chaque flacon est contrôlée avant que les 20 ml de la semence de travail ne soient transférés dans les 4 litres de milieu. Ces flacons sont incubés à 37°C pendant 4 à 6 jours selon la vitesse de croissance des mycoplasmes. Après le dépôt des filaments, l'antigène est obtenu par centrifugation à 2 600 *g* à partir des flacons non contaminés (les filaments sont fins et blancs et parfois regroupés sous forme de sapin renversé. Cela se produit vers 4 à 6 jours et c'est à ce moment là qu'ils deviennent lourds et se déposent). Le culot est remis en suspension dans une solution normale stérile et centrifugé pour éliminer les restes du milieu de culture. Le culot est à nouveau remis en suspension dans un faible volume de solution normale stérile de façon à former une suspension visqueuse.

Pour inactiver les mycoplasmes, il faut rajouter de la saponine à raison de 3 mg de saponine pour 1 ml d'antigène. Puis il faut agiter pendant une nuit à 4°C avec un agitateur magnétique.

NOTE : la saponine agit également comme un adjuvant. Trois échantillons sont prélevés aseptiquement dans cette suspension pour estimer la concentration en protéine, contrôler la stérilité et pratiquer les tests d'innocuité.

3. Contrôles en cours de fabrication

Pendant la production, les tests suivants sont mis en œuvre pour s'assurer que les produits restent purs et sûrs. Ces tests sont conduits par l'équipe d'assurance de la qualité. Des prélèvements aseptiques sont pratiqués dans chaque flacon avant l'inoculation pour les contrôles de stérilité.

Quand la culture est à maturité, seuls les flacons ne présentant pas de signes de contamination sont rassemblés et centrifugés ; les flacons contaminés sont décontaminés et éliminés après autoclavage.

Après inactivation par la saponine, un échantillon est prélevé aseptiquement pour contrôler la stérilité, un autre pour l'innocuité et un autre pour une estimation de la concentration protéique.

a) Test de stérilité

Ce test a pour but de vérifier l'absence de contamination bactérienne ou fongique. Deux tubes de thioglycollate sont ensemencés avec 1 ml de chaque échantillon. Les tubes contiennent environ 15 ml de bouillon. Ils sont incubés à 37°C pour éliminer les germes aérobies, microaérophiles et anaérobies. L'autre milieu utilisé est le bouillon de digestion de la caséine de soja ; 4 tubes sont ensemencés avec 12 ml de chaque prélèvement.

Deux tubes sont incubés à 37°C et deux autres à température ambiante (25°C) pour éliminer les contaminants bactériens ou fongiques. Tous les milieux sont incubés pendant 14 jours avec les témoins. L'absence de croissance indique que les échantillons ne sont pas contaminés.

b) Test d'innocuité

Ce test a pour but de démontrer l'absence de mycoplasmes vivants dans le vaccin : 0,3 ml d'antigène inactivé sont ajoutés dans un tube contenant 2,7 ml de bouillon de Newing modifié et on effectue des dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-9} . Le témoin positif est une culture viable de *M. capripneumoniae* et le témoin négatif correspond à 3 tubes de milieu non ensemencés. Tous les tubes sont incubés à 37°C pendant 12 jours. Le test est favorable si aucune croissance n'est observée dans les tubes inoculés avec les échantillons.

c) Estimation de la concentration en protéines

La concentration en protéine est estimée par la méthode à l'acide bicinchoninique en comparaison avec de l'albumine bovine normalisée.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Le test de stérilité sur le lot final est réalisé comme décrit dans la Section C.3.a sauf que les échantillons utilisés correspondent à un mélange de 4 flacons de chaque lot.

b) Innocuité

L'innocuité de chaque lot de vaccin doit être démontrée sur des animaux de laboratoire. Deux cobayes sont inoculés en intramusculaire dans le membre postérieur et deux autres sont inoculés par voie intrapéritonéale avec 0,5 ml contenant 5 doses de vaccin.

Si l'innocuité est bonne, les cobayes ne doivent exprimer aucun signe clinique pendant les 14 jours de la période d'observation, et lors de l'examen *post mortem*, on ne doit pas observer d'abcès sur le site d'injection ni dans la cavité péritonéale. L'innocuité est mauvaise si une mortalité pouvant être attribuée au vaccin se produit pendant la période d'observation ; de même si des abcès sont observés, soit sur le site d'injection, soit dans la cavité péritonéale.

c) Activité

Des recherches sont en cours au Kenya Agricultural Research Institute, Muguga, Kenya, pour développer un test d'activité.

d) Durée de l'immunité

Le vaccin protège les chèvres pendant 14 mois, mais il est recommandé d'effectuer un rappel au bout de 1 an.

e) Stabilité

Lorsqu'il est conservé à 4 °C, le vaccin a une durée de vie de 1 an. Avant l'emploi, le vaccin doit être agité longuement, pour favoriser la répartition homogène de l'antigène.

f) Agents de conservation

Pour l'instant, le vaccin ne contient pas d'agents de conservation.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Les effets secondaires du vaccin comprennent une réaction au niveau du site d'injection et de la fièvre, accompagnée d'inappétence, pendant 1 à 2 jours après l'injection. La réaction locale, qui est due à la saponine utilisée comme adjuvant, persiste entre 1 et 14 jours. L'injection accidentelle à l'homme provoque une irritation importante.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

L'innocuité de chaque lot de vaccin doit être testée sur animaux de laboratoire comme décrit en C.4.b.

b) Activité

Quand le test d'activité sera développé, chaque lot devra être testé.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ACHARYA R.M. (1992). Goat production. *In*: Recent advances in goat production. Fifth International Conference on Goats, New Delhi, India, March 1992, 49–94.
2. ARIF A., SCHULZ J., THIAUCOURT F., TAHA A. & HAMMER S. (2005). An outbreak of contagious caprine pleuropneumonia at Al Wabra Wildlife Preservation, State of Qatar. *J. Zoo Wildl. Med.*, **38**, 93–96.
3. BASCUNANA C.R., MATTSSON J.G., BOLSKE G. & JOHANSSON K.E. (1994). Characterization of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma* sp. strain F38 and development of an identification system based on PCR. *J. Bacteriol.*, **176**, 2577–2586.
4. BELTON D., LEACH R.H., MITCHELMORE D.L. & RURANGIRWA F.R. (1994). Serological specificity of a monoclonal antibody to mycoplasma strain F38, the agent of contagious caprine pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, **134**, 643–646.

5. BÓLSKE G., JOHANSSON K.-E., HEINONEN R., PANVUGA P.A. & TWINAMASIKO E. (1995). Contagious caprine pleuropneumonia in Uganda and isolation *Mycoplasma capricolum* subspecies *capripneumoniae* from goats and sheep. *Vet. Rec.*, **137**, 594.
6. BOLSKE G., MATTSSON J.G., BASCUNANA C.R., BERGSTROM K., WESONGA H. & JOHANSSON K.E. (1996). Diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia by detection and identification of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* by PCR and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 785–791.
7. BRADBURY J.M. (1983). Phosphate activity. *In: Methods in Mycoplasmaology*, Vol. 1, Razin S. & Tully J.G., eds. Academic Press, New York, USA, 363–366.
8. DIGHERO M.W., BRADSTREET C.M.P. & ANDREWS B.E. (1970). Dried paper discs for serological identification of human mycoplasmas. *J. Appl. Bacteriol.*, **33**, 750–757.
9. FREUNDT E.A. (1983). Proteolytic activity. *In: Methods in Mycoplasmaology*, Vol. 1, Razin S. & Tully J.G., eds. Academic Press, New York, USA, 367–371.
10. FREUNDT E.A., ANDREWS B.E., ERNO H., KUNZE M. & BLACK F.T. (1973). The sensitivity of Mycoplasmatales to sodium-polyanethol-sulfonate and digitonin. *Zentralbl. Bant Parasitkde*, (I Abt), **A225**, 104–112.
11. GOURLAY R.N. (1964). Antigenicity of *Mycoplasma mycoides*. 1. Examination of body fluids from cases of contagious bovine pleuropneumonia. *Res. Vet. Sci.*, **5**, 473–482.
12. GOURLAY R.N. (1983). Serological tests for the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia. *In: The Diagnosis of Contagious Bovine Pleuropneumonia and Other Infections with Mycoplasma mycoides subspecies mycoides*, Hall S.A., ed. CEC publication EUR 8654, Luxembourg, 27–32.
13. HOUSHAYMI B.M., MILES R.J. & NICHOLAS R.A.J. (2000). Studies on strains of *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* isolated from outbreaks of contagious caprine pleuropneumonia. *Small Ruminant Res.*, **45** (2), 139–143.
14. HOUSHAYMI B., TEKLEGHIOGIS T., WILSMORE A.F., MILES R.J. & NICHOLAS R.A.J. (2002). Investigations of outbreaks of contagious caprine pleuropneumonia in Eritrea. *Trop. Anim. Health Prod.*, **34**, 383–389.
15. HUTCHEON D. (1881). Contagious pleuro-pneumonia in angora goats. *Vet. J.*, **13**, 171–180.
16. HUTCHEON D. (1889). Contagious pleuropneumonia in goats at Cape Colony, South Africa. *Vet. J.*, **29**, 399–404.
17. JONES G.E. & WOOD A.R. (1988). Microbiological and serological studies on caprine pneumonia in Oman. *Res. Vet. Sci.*, **44**, 125–131.
18. KALINER G. & MACOWAN K.J. (1976). The pathology of experimental and natural contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Vet. Med. [B]*, **2**, 652–661.
19. KIBOR A.C. & WAIYAKI P.G. (1986). Growth of mycoplasma F38 in medium B (modified Hayflick) and Newing's typtose medium. *Bull. Anim. Health Prod. Afr.*, **34**, 157–159.
20. KROGSGAARD-JENSEN A. (1972). Mycoplasma: growth precipitation as a serodiagnostic method. *Appl. Microbiol.*, **23**, 553–558.
21. LITAMOI J.K., WANYANGU S.W. & SIMAM P.K. (1990). Isolation of *Mycoplasma* biotype F38 from sheep in Kenya. *Trop. Anim. Health Prod.*, **22**, 260–262.
22. LORENZON S., WESONGA H., YGESU L., TEKLEGHIOGIS T., MAIKANO Y., ANGAYA M., HEDRIKX P. & THIAUCOURT F. (2002). Genetic evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* strains and molecular epidemiology of contagious caprine pleuropneumonia by sequencing of locus H2. *Vet. Microbiol.*, **85**, 111–123.
23. LEACH R.H., ERNO H. & MACOWAN K.J. (1993). Proposal for designation of F38-type caprine mycoplasmas as *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* subsp. nov. and consequent obligatory relegation of strains currently classified as *M. capricolum* (Tully, Garile, Edward, Theodore & Erno, 1974) to an additional new subspecies, *M. capricolum* subsp. *capricolum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**, 603–605.
24. MACMARTIN D.A., MACOWAN K.J. & SWIFT L.L. (1980). A century of classical contagious caprine pleuropneumonia: from original description to aetiology. *Br. Vet. J.*, **136**, 507–515.

25. MACOWAN K.J. & MINETTE J.E. (1976). A mycoplasma from acute contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Trop. Anim. Health Prod.*, **8**, 91–95.
26. MACOWAN K.J. & MINETTE J.E. (1977). The role of mycoplasma strain F38 in contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Vet. Rec.*, **101**, 380–381.
27. MACOWAN K.J. & MINETTE J.E. (1977). Contact transmission of experimental contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). *Trop. Anim. Health Prod.*, **9**, 185–188.
28. MACOWAN K.J. & MINETTE J.E. (1978). The effect of high passage mycoplasma strain F38 on the courses of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). *Trop. Anim. Health Prod.*, **10**, 31–35.
29. MARCH J.B., GAMMACK C. & NICHOLAS R. (2000). Rapid detection of contagious caprine pleuropneumonia using a *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* capsular polysaccharide-specific antigen detection latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 4152–4159.
30. MANSO-SILVÁN L., PERRIER X. & THIAUCOURT F. (2007). Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 2247–2258.
31. MILES R.J. & WADHER B.J. (1990). Kinetics and pattern of substrate utilization by *Mycoplasma* spp. *Zentralbl. Bakteriol. (Suppl.)*, **20**, 675–676.
32. MOHAN K., MILES R.J. & WADHER B.J. (1990). Growth and biochemical characteristics of mycoplasmas isolated from the lungs of Nigerian goats. *Zentralbl. Bakteriol. (Suppl.)*, **20**, 841–843.
33. MUTHOMI E.K. & RURANGIRWA F.R. (1983). Passive haemagglutination and complement fixation as diagnostic tests for contagious caprine pleuropneumonia caused by the F38 strain mycoplasma. *Res. Vet. Sci.*, **35**, 1–4.
34. NICHOLAS R.A.J. (2002). Contagious caprine pleuropneumonia. Recent Advances in Goat Diseases, Tempesta M., ed., International Veterinary Information Service, Ithaca, NY, USA. www.ivis.org/advances/Disease_Tempesta/nicholas/chapter_frm.asp.
35. OZDEMIR U., OZDEMIR S., MARCH J., CHURCHWOOD C. & NICHOLAS R.A.J. (2005). Outbreaks of CCPP in the Thrace region of Turkey. *Vet. Rec.*, **156**, 286–287.
36. PERREAU P., LE GOFF C. & GIAUFFREA A. (1976). Le diagnostic serologique de l'agalaxie contagieuse des petits ruminants: un test de fixation du complement. *Bull. Acad. Vet. Fr.*, **49**, 185–192.
37. PETTERSSON B., BOLSKE G., THIAUCOURT F., UHLEN M. & JOHANSSON K.K. (1998). Molecular evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* strains based on polymorphisms in the 16S rRNA genes. *J. Bacteriol.*, **180**, 2350–2358.
38. ROSENDAL S. & BLACK F.T. (1972). Direct and indirect immunofluorescence of unfixed and fixed mycoplasma colonies. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **80**, 615–622.
39. RURANGIRWA F.R., MCGUIRE T.C., KIBOR A. & CHEMA S. (1987). A latex agglutination test for field diagnosis of caprine pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, **121**, 191–193.
40. RURANGIRWA F.R., MCGUIRE T.C., KIBOR A. & CHEMA S. (1987). An inactive vaccine for contagious caprine pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, **121**, 397–402.
41. RURANGIRWA F.R., MCGUIRE T.C., MAGNUSON N.S., KIBOR A. & CHEMA S. (1987). Composition of polysaccharide from mycoplasma (F-38) recognized by antibodies from goats with contagious caprine pleuropneumonia. *Res. Vet. Sci.*, **42**, 175–178.
42. RURANGIRWA F.R., MCGUIRE T.C., MUSOKE A.J. & KIBOR A. (1987). Differentiation of F38 mycoplasmas causing contagious caprine pleuropneumonia with a growth-inhibiting monoclonal antibody. *Infect. Immun.*, **55**, 3219–3220.
43. RURANGIRWA F.R., MCGUIRE T.C., WAMBUGU A.N. & KIHARA S.M. (1992). In: Ninth International Congress of the International Organization for Mycoplasma, August 2–7 1992, Ames, Iowa, USA. IOM Letters, Vol. 2 FP5/2, p. 128.
44. SENTERFIT L.B. & JENSEN K.E. (1996). Antimetabolic antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* measured by tetrazolium reduction inhibition. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **122**, 786–790.

45. TAYLOR T.K., BASHRUDDIN J.B. & GOULD A.R. (1992). Relationship between members of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by DNA probes and sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**, 593–601.
46. TAYLOR-ROBINSON D., PRUCELL R.H., WONG D.C. & CHANOCK R.M. (1966). A colour test for the measurement of antibody to certain mycoplasma species based on the inhibition of acid production. *J. Hyg. (Camb.)*, **64**, 91–104.
47. THIAUCOURT F. & BOLSKE G. (1996). Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmoses of sheep and goats. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **15**, 1397–1414.
48. THIAUCOURT F., BOLSKE G., LIBEAU G., LE GOFF C. & LEFEVRE P.-C. (1994). The use of monoclonal antibodies in the diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). *Vet. Microbiol.*, **41**, 191–203.
49. THIAUCOURT F., GUERIN C., MADY V. & LEFEVRE P.-C. (1992). Diagnostic de la pleuropneumonie contagieuse caprine: améliorations récentes. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **11**, 859–865.
50. WOUBIT S., LORENZON S., PEYRAUD A., MANSO-SILVAN L. & THIAUCOURT F. (2004). A specific PCR for the identification of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, the causative agent of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). *Vet. Microbiol.*, **104**, 125–132.

*

* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la pleuropneumonie contagieuse caprine (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).

AVORTEMENT ENZOOTIQUE DES BREBIS (chlamydiose ovine)

RÉSUMÉ

La chlamydiose ovine, aussi connue sous le nom d'avortement enzootique des brebis (AEB) ou avortement enzootique ovin est due à une bactérie Chlamydophila abortus. L'avortement à chlamydia survient classiquement dans les 2 ou 3 dernières semaines de gestation avec mortinatalité des agneaux et inflammation des placentas. Cependant, l'infection peut aussi se traduire par la mise bas à terme d'agneaux morts nés ou trop faibles pour survivre plus de 48 h. Les brebis infectées peuvent aussi mettre bas des agneaux en bonne santé, et il n'est pas rare d'observer la mise bas d'agneaux morts, d'agneaux faibles ou d'agneaux en bonne santé. Il n'existe aucun signe préalable à l'avortement bien que des changements de comportement et des écoulements vulvaires puissent être notés dans les dernières 48 h de la gestation.

Le diagnostic de l'avortement enzootique des brebis dépend de l'isolement et de l'identification de l'agent causal, ou de la détection de l'agent ou de son acide nucléique dans les produits de l'avortement ou dans les excréctions vaginales issues de femelles ayant récemment avorté. Une réponse humorale peut être détectée suite à un avortement. Les chèvres et les brebis, et moins fréquemment, les bovins, les porcs, les chevaux et les cervidés, peuvent être atteints. La chlamydiose des petits ruminants est une zoonose et l'organisme doit être manipulé en prenant les précautions de biosécurité ad hoc. Les femmes enceintes sont particulièrement à risque.

Identification de l'agent pathogène : *le diagnostic d'une infection à C. abortus repose sur l'historique abortif des brebis et des chèvres (souvent en fin de gestation), sur la mise en évidence d'une nécrose placentaire, et sur la mise en évidence d'un nombre important d'organismes dans des calques colorés de placentas infectés. La toison encore humide de l'avorton ou des écouvillons vaginaux réalisés sur des femelles ayant récemment avorté constituent également des prélèvements intéressants. Il est nécessaire de savoir différencier les dégâts provoqués par Toxoplasma gondii au niveau des cotylédons et, à partir de calques colorés, d'être averti des similarités morphologiques existantes entre C. abortus et Coxiella burnetii, l'agent de la fièvre Q.*

Les antigènes de Chlamydia peuvent être détectés par une réaction immuno-enzymatique (ELISA), par immunohistochimie ou par immunofluorescence, tandis que l'ADN peut être détecté par la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ou par des puces à ADN. Certaines de ces épreuves sont disponibles dans le commerce sous forme de kits de diagnostic.

Chlamydophila abortus ne peut être isolé que sur cellules vivantes ; dès lors, il est nécessaire de disposer, dans un laboratoire protégé, d'équipements pour la culture sur embryons de poulets ou pour la culture cellulaire.

Épreuves sérologiques : *une élévation du titre anticorps anti-C. abortus, détectée par la technique de fixation du complément (FC), est courante après un avortement ou la naissance d'un animal mort-né, mais ne se produit pas systématiquement. Chlamydophila abortus partage des épitopes communs avec C. pecorum et quelques bactéries à Gram négatif, dès lors le test de FC n'est pas complètement spécifique et ne permet pas non plus de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés. De faibles titres obtenus avec un test de FC doivent être interprétés avec précaution, en particulier s'ils sont observés pour un seul animal ou au sein de troupeaux n'ayant pas d'historique d'avortements.*

Des épreuves sérologiques alternatives ont été développées et certaines sont commercialisées, mais aucune n'a été suffisamment évaluée jusqu'à présent pour un usage sur le terrain. Une

réaction d'hypersensibilité retardée envers un antigène de chlamydia peut être induite chez des brebis infectées, mais cette épreuve n'est pas acceptable pour un usage en routine.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : des vaccins inactivés et vivants sont disponibles et ont été décrits comme prévenant les avortements et réduisant l'excrétion. Ils aident au contrôle de la maladie mais ne l'éradiquent pas. Le dépistage sérologique dans la période suivant la mise-bas permet d'identifier les troupeaux infectés, ce qui permet de mettre en œuvre les mesures de contrôle nécessaires.

A. INTRODUCTION

La chlamydiose ovine (avortement enzootique des brebis [AEB], ou avortement enzootique ovin) est due à une bactérie *Chlamydophila abortus*. L'avortement à *Chlamydia* en fin de gestation génère de sérieuses pertes de production dans de nombreuses régions à travers le monde d'élevage ovin, en particulier pour des troupeaux confinés durant la période de gestation (1, 19). Classiquement, l'avortement survient au cours des 2 à 3 dernières semaines de la gestation avec mortinatalité et inflammation du placenta. L'infection peut aussi entraîner la naissance à terme d'agneaux mort-nés ou trop faibles pour survivre au-delà de 48 h. Il n'est pas rare non plus, dans les cas de gestation multiple, que les brebis infectées donnent naissance à un agneau mort et un ou plusieurs agneaux faibles ou en bonne santé. En règle générale, l'infection est introduite dans un troupeau sain lors de l'achat d'animaux infectés ; elle débute par quelques avortements la première année, suivis la deuxième année par une « tornade d'avortements » qui peut affecter environ 30 % des brebis.

Les animaux infectés ne présentent pas de signes cliniques avant l'avortement, bien que des changements du comportement et des écoulements vulvaires puissent être notés chez les brebis au cours des dernières 48 h de gestation. La pathogénie débute environ à 90 jours de la gestation et coïncide avec la phase rapide de croissance du fœtus alors que l'invasion des *Chlamydia* dans les placentomes produit une réponse inflammatoire diffuse et progressive, une thrombose vasculaire et une nécrose tissulaire. Des changements modérés se produisent dans le foie et les poumons du fœtus et, dans le cas où les dommages placentaires sont sévères, il peut y avoir des dégâts cérébraux (6). L'avortement résulte probablement d'une combinaison de facteurs incluant une diminution des échanges nutritifs et gazeux entre la mère et le fœtus, d'une interruption de la régulation hormonale de la gestation et d'une agression induite par les cytokines (10).

L'avortement à *Chlamydia* se produit aussi chez les chèvres et moins fréquemment chez les bovins, les porcs, les chevaux et les cervidés. Chez la brebis, l'avortement en fin de gestation associé à une expulsion de membranes fœtales nécrosées est une indication clé pour établir le diagnostic, avec toutefois la nécessité de distinguer avec le profil diffus d'une forme nécrosée induite par *Toxoplasma gondii* (seulement les cotylédons). La distinction des autres causes infectieuses d'avortement telles que la brucellose (voir Chapitre 2.7.2.), la fièvre Q (voir Chapitre 2.1.12.) ou d'autres agents pathogènes bactériens (*Campylobacter* [voir Chapitre 2.9.3.], *Listeria* [voir Chapitre 2.9.7.], *Salmonella* [voir Chapitre 2.9.9.]) peut être effectuée par microscopie et/ou par culture.

D'un point de vue taxonomique, la famille des *Chlamydiaceae* est divisée en 2 genres et 9 espèces à partir de l'analyse des gènes ARNr 16S et 23S (12). 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* (oiseaux), *C. felis* (chat), *C. abortus* (brebis, chèvre, vache), *C. caviae* (cochon d'inde), l'ancienne espèce *C. pecorum* (brebis et vache) et *C. pneumoniae* (humain). Les 2 genres et les 9 espèces se différencient sur la base de leurs structures moléculaires et selon leurs gammes d'hôtes et de la maladie clinique. L'espèce présente un fort degré de corrélation avec l'hôte, le syndrome de la maladie et la virulence, aidant à la compréhension de l'épidémiologie de nombreuses espèces et sérovars affectant les mammifères et les oiseaux. Les termes « chlamydiose » et « chlamydia(e) » sont utilisés pour évoquer les membres de chacun des 2 genres. Cependant, une combinaison d'un nom générique et d'un nom spécifique est utilisée pour se référer à une espèce particulière de chlamydia.

Les femelles infectées excrètent de nombreuses particules infectieuses de *C. abortus* au moment de l'avortement ou de la mise-bas, particulièrement dans le placenta et les décharges utérines (23). La contamination du milieu qui en résulte est considérée comme la principale source d'infection pour les autres femelles. Il existe aussi des arguments qui laissent penser que des brebis ayant avorté après une infection expérimentale peuvent excréter des *Chlamydia* par les voies génitales, au cours des œstrus suivants (23). L'homme peut se contaminer à partir des avortons ou des produits infectés, ou à partir de cultures de laboratoire non manipulées de façon *ad hoc* ; les effets variant d'une infection subclinique à un symptôme grippal sévère. Des précautions appropriées doivent être mises en place lors de la manipulation de culture ou de tissus infectés (voir Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries »). Des cas humains authentifiés d'inflammation placentaire et d'avortements dus à *C. abortus* d'origine ovine indiquent que les femmes enceintes sont particulièrement à risque et ne doivent pas être exposées à des sources d'infection (7, 19).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

a) Calques

Dans un troupeau où un historique clinique et où les lésions des placentas expulsés suggèrent un avortement enzootique, un diagnostic peut être établi à partir de l'examen microscopique de calques fait à partir des villosités placentaires atteintes ou des chorions adjacents. Plusieurs techniques de coloration sont satisfaisantes, par exemple, la technique modifiée de Machiavello Giemsa, différentielle des *Brucella*, ou les colorants modifiés de Ziehl-Neelsen (28). Pour des cas positifs colorés par la dernière méthode et examinés à l'aide d'un microscope à forte résolution, un nombre important de petits corps élémentaires de forme coccoïde (300 nm) sont vus isolés ou groupés en rouge sur fond bleu correspondant aux débris cellulaires. Avec un microscope à fond noir, les corps élémentaires apparaissent en vert pâle. Si le placenta n'est pas disponible, des calques peuvent être faits à partir d'écouvillons vaginaux réalisés dans les 24 h suivant la délivrance, ou à partir de la toison humide d'un avorton ou d'un agneau mort-né n'ayant pas été nettoyé par sa mère. En général, de telles préparations contiennent moins d'organismes que des calques effectués à partir des placentas.

En terme de morphologie et en ce qui concerne les caractéristiques de coloration, *C. abortus* ressemble à la rickettsie *Coxiella burnetii*, qui, dans certains cas, peut provoquer des avortements et qui, chez l'homme, provoque la fièvre Q. Il faut être vigilant pour différencier les deux organismes, lorsqu'il manque des éléments ou en cas d'absence d'une atteinte placentaire induite par *Chlamydia*. Les différences antigéniques entre *C. abortus* et *Coxiella burnetii* peuvent être mises en évidence sérologiquement. Des épreuves d'immunofluorescence (IF) reposant sur l'utilisation d'un antisérum spécifique ou d'un anticorps monoclonal peuvent être utilisées pour identifier *C. abortus* à partir des calques.

b) Détection des antigènes

Plusieurs épreuves basées sur la détection d'antigènes spécifiques d'espèces sont disponibles dans le commerce. Une étude comparative de plusieurs kits de diagnostic, réalisée sur du matériel non ovine, indiquait que celles reposant sur une méthodologie immuno-enzymatique (ELISA) étaient plus sensibles que celles reposant sur l'IF (34). Dans les conditions de l'étude, un kit de diagnostic reposant sur la détection du lipopolysaccharide (LPS) de chlamydia a été jugé comme étant plus sensible que les autres kits évalués et basés sur le principe ELISA. Malgré quelques résultats faussement positifs, en particulier pour les fientes, ce kit de diagnostic donne aussi des résultats satisfaisants avec des échantillons de placenta ovine (33). Sur des coupes histologiques, la détection des antigènes peuvent être réalisées en utilisant des anticorps anti-*Chlamydia* dirigés contre le LPS ou la protéine majeure de la membrane externe (MOMP : major outer membrane protein) disponible dans le commerce (5).

c) ADN

L'amplification en chaîne par polymérase (PCR) de l'ADN de *Chlamydia* et une épreuve de PCR en temps réel sont une alternative pour vérifier la présence de la bactérie dans les échantillons biologiques sans avoir recours à la culture. Dans ce contexte, la PCR est une technique très sensible (27), mais qui présente aussi un risque de contaminations croisées entre les échantillons. Des mesures appropriées doivent être prises pour les éviter (voir Chapitre 1.1.7., « Les biotechnologies dans le diagnostic des maladies infectieuses et le développement des vaccins »). Un autre problème éventuel est la production de résultats faussement négatifs du fait de la présence de substances inhibitrices de la réaction de PCR dans les échantillons. Des méthodes moléculaires permettant la discrimination entre *C. abortus* et *C. pecorum* ont été décrites (8, 11, 15, 18, 31). Ces techniques commencent à être transférées aux laboratoires de diagnostic en Europe. Récemment, des épreuves d'hybridation en micro-système utilisant la plateforme ArrayTube™ ont été mises au point et semblent prometteuses quant à la détection et l'identification directes des organismes dans les prélèvements (9, 25).

d) Coupes de tissus

Les inclusions contenant les *Chlamydia* intracellulaires peuvent être mises en évidence par la coloration de Giemsa sur des coupes fines ($\leq 4 \mu\text{m}$) issues de tissus cibles ayant été correctement fixés dans du liquide de Bouin ou de Carnoy, par exemple. De meilleurs résultats peuvent être obtenus à l'aide de procédés de coloration immunologique. La méthode directe avec une immunoperoxydase (13) est rapide et simple, tandis que la méthode avec la streptavidine-biotine est plus complexe (29). La microscopie électronique peut également être utilisée en contraste négatif, afin de différencier *Chlamydia* de *Coxiella burnetii*.

e) Isolement de l'agent pathogène

Chlamydomphila abortus peut être isolée à partir d'œufs embryonnés de poule ou de cultures cellulaires, ces dernières étant la méthode de choix pour l'isolement de nouvelles souches. L'agent causal de la chlamydiose est zoonotique (19), dès lors les méthodes d'isolement et d'identification doivent être réalisées dans une zone de confinement appropriée, comme décrit dans le Chapitre 1.1.2.

Les échantillons tissulaires tels que les cotylédons atteints, les membranes placentaires, les poumons ou le foie du fœtus, les écouillons vaginaux, qui doivent être mis en culture rapidement, doivent être maintenus durant cette période dans un milieu de transport approprié. Le milieu le plus satisfaisant est le milieu sucrose/phosphate/glutamate ou milieu SPG (sucrose [74,6 g/litre], KH_2PO_4 [0,512 g/litre], K_2HPO_4 [1,237 g/litre], acide L-glutamique [0,721 g/litre]) supplémentés avec 10 % de sérum fœtal bovin, des antibiotiques (la streptomycine et la gentamicine peuvent être utilisés, mais pas la pénicilline) et un fongistatique (27). Un ratio tissu/milieu de 1/10 est communément utilisé. Alternativement, environ 1 g de tissu est broyé en présence de sable stérile et de 8 ml de milieu de transport.

Embryons de poulet : les échantillons à analyser sont préparés à 10 % en milieu nutritif contenant de la streptomycine (pas de pénicilline) (200 µg/ml) et 0,2 ml de cette suspension sont inoculés dans le sac vitellin d'embryons âgés de 6 à 8 jours incubés à 37 °C. Les embryons infectés meurent entre le 4^e et 13^e jour suivant l'inoculation. Les calques préparés à partir des membranes vitellines vascularisées révèlent la présence de nombreux corps élémentaires.

Cultures cellulaires : *Chlamydomphila abortus* d'origine ovine peut être isolé à partir de nombreuses lignées cellulaires, mais les cellules McCoy, BGM (Buffalo green monkey) ou BHK (Baby hamster kidney) sont les plus couramment utilisées. Pour un diagnostic de confirmation, les cellules monocouches sont resuspendues en milieu de culture à raison de 2×10^5 cellules/ml. 2 ml de cette suspension cellulaire sont distribués dans des flasques de culture cellulaire dotées d'un bouchon de 16 mm. Les monocouches confluentes se forment après 24 h d'incubation à 37 °C. Le milieu de croissance est éliminé puis remplacé par 2 ml d'inoculum à tester. Les flacons sont centrifugés à 2 500 *g* pendant 30 min afin de favoriser l'infection. Après une incubation de 2 à 3 jours, le tapis cellulaire est fixé au méthanol et coloré par la méthode de Giemsa ou de Gimenez (3, 14). Après la fixation, les cellules infectées contiennent des inclusions intracytoplasmiques basophiles (Giemsa) ou éosinophiles (Gimenez). Des procédures similaires sont utilisées pour produire des antigènes de *C. abortus*. Les techniques d'IF peuvent aussi être utilisées et sont aussi efficaces.

L'infectivité des *Chlamydia* peut être augmentée par un traitement chimique des cellules cultivées, avant ou pendant l'infection, pour favoriser la croissance des *Chlamydia*. Parmi les nombreuses molécules décrites : la cycloheximide (0,5 µg/ml) ajoutée dans le milieu de croissance, l'émétine (1 µg/ml) ajoutée 5 min avant l'infection, et la 5-iodo-2-déoxyuridine (80 µg/ml) inclus dans le milieu de culture cellulaire dans les 3 jours précédant l'infection. À condition que les cellules pré-conditionnées soient disponibles, la dernière technique d'isolement nécessite un délai supérieur pour un isolement réussi de l'agent.

2. Épreuves sérologiques

a) Réaction de fixation du complément

La technique de fixation du complément (FC) est la méthode la plus couramment utilisée pour détecter l'infection (brebis et chèvres sont généralement testées dans les 3 mois suivant l'avortement ou la mise-bas). L'épreuve détecte aussi les animaux vaccinés. L'infection est évidente principalement durant l'infection active du placenta, dans le dernier mois de gestation et après la bactériémie qui souvent accompagne l'avortement. Dès lors, des sérums appariés collectés au moment de l'avortement et au plus tard 3 semaines après peuvent révéler une élévation du titre anticorps par la technique de FC qui peut permettre un diagnostic rétrospectif. Les réactions croisées entre *C. abortus* et *C. pecorum*, et aussi avec quelques bactéries à Gram négatif (ex : *Acinetobacter*), peuvent générer des résultats faussement positifs avec la technique de FC. Dès lors des titres inférieurs au 1/32 pour un seul individu doivent être considérés comme non spécifiques de *C. abortus*, bien qu'ils puissent être dus à un faible taux d'infection à *C. abortus*. Les résultats douteux peuvent être ultérieurement testés par analyse Western blot en utilisant des corps élémentaires purifiés (17).

L'antigène est préparé à partir d'une membrane vitelline fortement infectée obtenue à partir d'un embryon de poulet inoculé de la même façon que celle utilisée pour isoler l'organisme à partir d'un prélèvement du terrain. La préparation de l'antigène doit être réalisée dans un laboratoire protégé en prenant les précautions de biosécurité pour prévenir une contamination humaine (voir Chapitre 1.1.2.). Les membranes collectées et broyées sont diluées en tampon phosphate pH 7,6, à raison de 2 ml par membrane. Après l'élimination des débris, le surnageant est centrifugé à 10 000 *g* pendant 1 h à 4 °C, le dépôt est resuspendu dans un petit volume de tampon, et un calque de cette suspension est examiné pour s'assurer du fort niveau de contamination par chlamydia. La suspension est inactivée dans un bain bouillonnant pendant 20 min ou par autoclavage, de l'azide

de sodium (0,3 %) est ajouté comme conservateur. L'antigène peut aussi être préparé à partir d'une culture cellulaire infectée avec *C. abortus*. Les monocouches infectées sont mises en suspension en tampon phosphate, pH 7,6, et les cellules sont lysées par homogénéisation ou par ultrasonication. Les débris produits sont éliminés et la suite du protocole est la même que celle décrite pour la préparation de l'antigène à partir de membranes vitellines infectées. Pour chacun des deux modes de préparation, le test de FC doit être effectué avec du complément et un antisérum normalisés afin de définir la dilution optimale de l'antigène produit.

b) Autres tests

Les réponses sérologiques envers *C. abortus* et *C. pecorum* peuvent être différenciées par une épreuve indirecte de micro-immunofluorescence, mais la procédure est trop longue pour être faite en diagnostic de routine. Les tests ELISA développés de façon indépendante par plusieurs groupes de recherche n'ont pas été adaptés pour le diagnostic de routine, en partie à cause des difficultés liées à l'utilisation d'antigènes particuliers. Toutefois, un nouveau test ELISA reposant sur un antigène stable et soluble a été utilisé pour tester des échantillons du terrain ou issus d'expérimentation et a présenté, en dépit d'un manque de spécificité, une meilleure sensibilité que le test de FC (2, 17). Des ELISA de compétition reposant sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux (26) et des ELISA indirects utilisant un antigène recombinant (20) ont été mis au point et se sont révélés plus sensibles et plus spécifiques que la FC, ce qui permet de différencier les anticorps produits par *C. abortus* de ceux induits par *C. pecorum*. Cependant, ces tests sont, à l'heure actuelle, surtout utilisés comme outils de recherche et n'ont pas fait l'objet d'une adaptation en vue de la commercialisation. Un certain nombre d'épreuves sérologiques disponibles dans le commerce ont été évaluées et comparées avec les tests préparés « au laboratoire » et les résultats sont variables (17, 32). Aucun de ces tests disponibles dans le commerce ne peut faire la différence entre des titres post-vaccination et ceux dus à une infection naturelle (4).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Actuellement, deux types de vaccins (inactivés et vivants atténués) sont disponibles commercialement, afin d'être administrés par voie intramusculaire ou sous-cutanée au moins 4 semaines avant la monte pour prévenir les avortements. Un vaccin recombinant multi-composants dirigé contre *C. abortus* est l'objectif futur (21).

Les vaccins inactivés peuvent être préparés à partir de membranes vitellines infectées ou de cultures cellulaires (16) et contiennent des organismes entiers ou des fractions d'organismes (30), en prenant toutes les précautions de biosécurité pour prévenir les contaminations humaines (voir Chapitre 1.1.2.). Les utilisateurs du vaccin inactivé qui contiennent des adjuvants à base d'huile minérale doivent observer de grandes précautions car une injection peut entraîner une grave inflammation locale et une nécrose des tissus. Le vaccin atténué vivant du commerce est composé d'un mutant thermosensible induit chimiquement qui est cultivé à 35 °C, au lieu de 39,5 °C qui est la température corporelle normale des moutons (24). Ce vaccin est livré sous forme lyophilisée et doit être reconstitué en diluant juste avant l'administration. Des précautions doivent être prises pour protéger les techniciens lors de la manipulation de ce vaccin vivant, en particulier les immunodéprimés et les femmes enceintes. Par ailleurs, il est important de signaler que ce vaccin vivant ne doit pas être administré à des animaux recevant un traitement antibiotique, notamment des tétracyclines.

Chacun a un rôle à jouer dans le contrôle de la maladie, mais aucun ne confère une protection absolue après une épreuve virulente ou supprime complètement le portage des agents infectieux. Néanmoins, les animaux vaccinés exposés à une infection présentent un taux d'avortement plus bas et une excrétion de chlamydies réduite pour au moins les 2 ou 3 gestations suivant la vaccination. Il a été avancé que le vaccin vivant pourrait aider à l'éradication de la maladie (22).

1. Gestion des semences bactériennes

a) Caractéristique de la semence bactérienne

Un ou plusieurs isolats issus d'avortement ovins se multipliant de façon correcte sur le substrat choisi convient(nent), et un passage précoce de la semence stock peut être réalisé. Alternativement, un isolat qui a été adapté à l'embryon de poulet par de multiples passages (>100) peut être utilisé. Dès lors, les embryons peuvent être utilisés pour la production de vaccins. Bien que l'adaptation à l'embryon puisse diminuer la virulence des isolats pour la brebis, il n'existe pas de preuve qu'un tel changement réduise son efficacité de protection comme vaccin inactivé.

b) Méthode de culture

Pour des isolats avec un faible nombre de passages, les procédures décrites pour la préparation des antigènes pour la technique de FC sont parfaitement adaptées et amplifiées pour la production des vracs.

Une fois la suspension finale collectée, une partie aliquote est prélevée pour le titrage de son infectivité. Le vrac est traité au formol à une concentration finale de 0,4 %, et stocké jusqu'à ce que les tests de stérilité confirment la complète inactivation.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Avant l'inoculation d'un grand nombre d'embryons ou de cultures cellulaires, la viabilité et l'absence de contamination de la semence stock doivent être vérifiées. Il peut être pratique de collecter la production en des lots séparés. Dans ce cas, l'infectivité de chaque partie aliquote de chacun des lots doit être séparément évaluée afin de s'assurer que chacun d'entre eux remplit les conditions requises (voir Section C.2. ci-dessous). Stocker sous des conditions réfrigérées.

2. Méthode de fabrication

La suspension récoltée et inactivée est centrifugée et resuspendue en tampon salin phosphate contenant 0,2 % de formol d'un volume présentant un titre infectieux avant inactivation d'approximativement 10^8 unités infectieuses/ml. Généralement, la suspension aqueuse est mélangée avec un adjuvant huileux, soit directement, soit après une précipitation à l'alum de potasse ($\text{AlK}[\text{SO}_4]_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$). Un agent de conservation, tel que le thiomersal, peut aussi être ajouté à raison de 0,01 %.

3. Contrôles en cours de fabrication

Les principales exigences consistent à s'assurer de la croissance adéquate de *C. abortus*, à éviter les co-infections du substrat de culture, à s'assurer à la fois de l'inactivation complète et de la prise de conscience du risque biologique par les personnes intervenant lors du procédé de fabrication.

4. Contrôles des lots

Chaque lot de vaccin produit doit être testé pour sa stérilité, son innocuité et son activité.

a) Stérilité

Les tests pour le contrôle de stérilité et d'absence de contaminants dans les produits biologiques sont présentés dans le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

L'inoculation par voie sous-cutanée à 2 (ou plus) brebis séronégatives avec le double de la dose normale (généralement 1,0 ml) du vaccin ne doit pas induire de réaction systémique, mais les vaccins adjuvés en huile peuvent provoquer un gonflement froid au site d'inoculation.

c) Activité

Jusqu'à présent, l'activité est évaluée par l'étude de la réponse sérologique induite chez une brebis négative suite à l'injection, par voie sous cutanée, de 1 ml de vaccin. Les échantillons de sang collectés avant et 28 jours après la vaccination sont comparés. Fondamentalement, l'activité devrait être évaluée dans le cadre d'une infection expérimentale ou sur le terrain, mais aucune corrélation *in vitro* avec l'efficacité de protection n'a pour l'heure été établie.

d) Durée de l'immunité

Aucune donnée de la part des producteurs n'est disponible, mais il est recommandé de revacciner après 1 à 3 ans, en fonction du risque d'exposition.

e) Stabilité

Les vaccins stockés sous froid (5 ± 3 °C) doivent rester stable durant au moins 1 an. Avant utilisation, ils doivent être maintenus à température ambiante pendant 24 h, et le flacon doit être agité vigoureusement avant son administration.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir Section C.4.b.

b) Activité

Voir Section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AITKEN I.D. (2000). Chlamydial abortion. *In: Diseases of Sheep Third Edition*, Martin W.B. & Aitken I.D., eds. Blackwell Scientific Ltd., Oxford, UK, 81–86.
2. ANDERSON I.E., HERRING A.J., JONES G.E., LOW J.C. & GREIG A. (1995). Development and evaluation of an indirect ELISA to detect antibodies to abortion strains of *Chlamydia psittaci* in sheep sera. *Vet. Microbiol.*, **43**, 1–12.
3. ARENS M. & WEINGARTEN M. (1981). Vergleichende Untersuchungen an Buffalo Green monkey (BGM) Zellen und Mäusen zur Isolierung von *Chlamydia psittaci* aus Kot und Organproben von Vögeln. *Zentralbl. Veterinarmed [B]*, **28**, 301–309.
4. BOREL N., SACHSE K., RASSBACH A., BRUCKNER L., VRETOU E., PSARROU E. & POSPISCHIL A. (2005). Ovine enzootic abortion (OEA): antibody response in vaccinated sheep compared to naturally infected sheep. *Vet. Res. Commun.*, Suppl 1, 151–156.
5. BOREL N., THOMA R., SPAENI P., WEILENMANN R., TEANKUM K., BRUGNERA E., ZIMMERMANN D.R., VAUGHAN L. & POSPISCHIL A. (2006). *Chlamydia*-related abortions in cattle from Graubünden, Switzerland. *Vet. Pathol.*, **43**, 702–708.
6. BUXTON D., ANDERSON I.E., LONGBOTTOM D., LIVINGSTONE M., WATTEGADERA S. & ENTRICAN G. (2002). Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. *J. Comp. Pathol.*, **127**, 133–141.
7. CAUL E.O. & SILLIS M. (1998). Chlamydiosis. *In: Zoonoses, Clinical Practice and Public Health Control*, Palmer S.R., Lord Soulsby & Simpson D.I.H., eds. Oxford University Press, Oxford, UK, 53–65.
8. DEGRAVES F.J., GAO D., HEHNEN H.-R., SCHLAPP T. & KALTENBOECK B. (2003). Quantitative detection of *Chlamydia psittaci* and *C. Pecorum* by high-sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1726–1729.
9. EHRLICH R., SLICKERS P., GOELLNER S., HOTZEL H. & SACHSE K. (2006). Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol. Cell Probes*, **20**, 60–63.
10. ENTRICAN G. (2002). Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J. Comp. Pathol.*, **126**, 79–94.
11. EVERETT K.D. & ANDERSEN A.A. (1999). Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR RFLP. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 803–813.
12. 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 of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. System. Bact.*, **49**, 415–440.
13. FINLAYSON J., BUXTON D., ANDERSON I.E. & DONALD K.M. (1985). Direct immunoperoxidase method for demonstrating *Chlamydia psittaci* in tissue sections. *J. Clin. Pathol.*, **38**, 712–714.
14. GIMENEZ D.F. (1964). Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Technol.*, **39**, 135–140.
15. JEE J., DEGRAVES F.J., KIM T. & KALTENBOECK B. (2004). High prevalence of natural *Chlamydophila* species infection in calves. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5664–5672.
16. JONES G.E., JONES K.A., MACHELL J., BREBNER J., ANDERSON I.E. & HOW S. (1995). Efficacy trials with tissue-culture grown, inactivated vaccines against chlamydial abortion in sheep. *Vaccine*, **13**, 715–723.
17. JONES G.E., LOW J.C., MACHELL J. & ARMSTRONG K. (1997). Comparison of five tests for the detection of antibodies against chlamydial (enzootic) abortion of ewes. *Vet. Rec.*, **141**, 164–168.

18. LAROUCAU K., SOURIAU A. & RODOLAKIS A. (2001). Improved sensitivity of PCR for *Chlamydomphila* using *pmp* genes. *Vet. Microbiol.*, **82**, 155–164.
19. LONGBOTTOM D. & COULTER L.J. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J. Comp. Pathol.*, **128**, 217–244.
20. LONGBOTTOM D., FAIRLEY S., CHAPMAN S., PSARROU E., VRETOU E. & LIVINGSTONE M. (2002). Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydomphila abortus*. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4235–4243.
21. LONGBOTTOM D. & LIVINGSTONE M. (2006). Vaccination against chlamydial infections of man and animals. *Vet. J.*, **171**, 263–275.
22. NIETFELD J.C. (2001). Chlamydial infections in small ruminants. *Update on Small Ruminant Medicine*, **17**, 2.
23. PAPP J.R., SHEWEN P.E. & GARTLEY (1994). Abortion and subsequent excretion of chlamydiae from the reproductive tract of sheep. *Infect. Immun.*, **62**, 3786–3792.
24. RODOLAKIS A. (1986). Use of a live temperature-sensitive vaccine in experimental and natural infections. In: *Chlamydial Diseases of Ruminants*, Aitken I.D., ed. Commission of the European Communities, Luxembourg, 71–77.
25. SACHSE K., HOTZEL H., SLICKERS P., ELLINGER T. & EHRLICH R. (2005). DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydomphila* spp. *Mol. Cell Probes*, **19**, 41–50.
26. SALTÍ-MONTESANTO V., TSOLI E., PAPAVALSILIOU P., PSARROU E., MARKEY B.M., JONES G.E. & VRETOU E. (1997). Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 228–235.
27. 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.
28. STAMP J.T., MCEWEN A.D., WATT J.A.A. & NISBET D.I. (1950). Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. *Vet. Rec.*, **62**, 251–254.
29. SZEREDI L. & BACSADI A. (2002). Detection of *Chlamydomphila* (*Chlamydia*) *abortus* and *Toxoplasma gondii* in smears from cases of ovine and caprine abortion by the streptavidin-biotin method. *J. Comp. Pathol.*, **127**, 257–263.
30. TAN T.W., HERRING A.J., ANDERSON I.E. & JONES G.E. (1990). Protection of sheep against *Chlamydia psittaci* infection with a subcellular vaccine containing the major outer membrane protein. *Infect. Immun.*, **58**, 3101–3108.
31. THIELE D., WITTENBRINK M.M., FISCHER D. & KRAUSS H. (1992). Evaluation of the polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Chlamydia psittaci* in abortion material from ewes. *Zentralbl. Bakteriol.*, **277**, 446–453.
32. VRETOU E., RADOUANI F., PSARROU E., KRITIKOS I., XYLOURI E. & MANGANA O. (2007). Evaluation of two commercial assays for the detection of *Chlamydomphila abortus* antibodies. *Vet. Microbiol.*, **123**, 153–161.
33. WILSMORE A.J. & DAVIDSON I. (1991). 'Clearview' rapid test compared with other methods to diagnose chlamydial infection. *Vet. Rec.*, **128**, 503–504.
34. WOOD M.M. & TIMMS P. (1992). Comparison of nine antigen detection kits for diagnosis of urogenital infections due to *Chlamydia psittaci* in koalas. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 3200–3205.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour l'avortement enzootique des brebis (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).

CHAPITRE 2.7.8.

MALADIE DU MOUTON DE NAIROBI

Se reporter au Chapitre 2.9.1. Maladies animales à Bunyavirus (Fièvre de la Vallée du Rift non comprise).

*
* *

ÉPIDIDYMYTE CONTAGIEUSE OVINE (*Brucella Ovis*)

RÉSUMÉ

Brucella ovis produit chez le mouton une maladie clinique ou subclinique, caractérisée par des lésions génitales chez le bélier et une placentite chez la brebis. Les conséquences en sont une baisse de fertilité chez le bélier, de rares avortements chez la brebis et une augmentation de la mortalité périnatale. La maladie a été signalée dans des pays d'Amérique Latine, d'Amérique du Nord et d'Europe ainsi qu'en Australie et en Afrique du Sud, mais elle est probablement présente dans la plupart des pays pratiquant l'élevage du mouton.

Identification de l'agent pathogène : l'existence de lésions (épididymite unilatérale ou, plus rarement, bilatérale) chez des béliers permet de suspecter la présence de l'infection, mais des examens de laboratoire sont nécessaires pour confirmer le diagnostic. La confirmation de laboratoire se fonde sur des méthodes directes ou indirectes. Le diagnostic direct consiste en la recherche bactériologique sur milieu sélectif approprié de *B. ovis* dans des prélèvements de sperme ou d'organes chez le bélier, des sécrétions vaginales et de lait chez la brebis. Des méthodes moléculaires, telles que l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ou l'électrophorèse en champs pulsés sont en cours de développement. Cependant le diagnostic indirect sérologique est préférentiellement utilisé en diagnostic de routine.

Épreuves sérologiques : les épreuves de fixation du complément (FC), d'immunodiffusion en gélose (IDG) et immuno-enzymatiques indirectes (ELISA), utilisant des antigènes de surface solubles obtenus à partir de *B. ovis*, peuvent être employées. Des ELISA utilisant des protéines recombinantes et des anticorps monoclonaux sont en cours d'évaluation dans des essais terrain. La sensibilité de l'IDG est semblable à celle de l'ELISA et l'ELISA montre parfois une sensibilité supérieure à celle de la FC. L'utilisation combinée de l'IDG et de l'ELISA semble donner les meilleurs résultats en termes de sensibilité. Cependant, en termes de simplicité et de coût, l'IDG est l'épreuve la plus pratique pour le diagnostic de *B. ovis*. Cependant, du fait de l'absence de techniques normalisées et reconnues au niveau international pour l'ELISA et l'IDG, l'épreuve prescrite pour les échanges internationaux demeure la FC.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : les semences utilisées pour la production des antigènes et des vaccins doivent provenir de laboratoires reconnus au plan international. Une dose normale unique (10^9 unités formant colonie [UFC]) du vaccin vivant Rev.1 de *B. melitensis*, administré par voie sous-cutanée ou conjonctivale, est d'une totale innocuité et est efficace chez le bélier pour la prévention de l'infection à *B. ovis*. Ce vaccin doit répondre à des exigences minimales en matière de concentration, de phase de dissociation, de virulence résiduelle et d'immunogénicité et d'absence de contaminants (voir le Chapitre 2.7.2., « Brucellose ovine et caprine [Infection à *B. ovis* exclue] »).

A. INTRODUCTION

Brucella ovis est à l'origine d'une infection génitale chez les ovins, qui se manifeste par de l'épididymite, des avortements peu fréquents et une mortalité d'agneaux augmentée. La transmission vénérienne passive par le biais de la brebis apparaît comme le mode de transmission le plus fréquent, mais la transmission de bélier à

bélier est également commune¹ (2). Les brebis infectées peuvent excréter *B. ovis* dans les sécrétions vaginales et dans le lait et les transmissions de brebis à bélier et de brebis en lactation à agneau sont également importantes.

L'observation de lésions génitales (épididymite unilatérale ou plus rarement bilatérale) par palpation des testicules des béliers constitue une présomption d'infection du troupeau. Cependant, le diagnostic clinique manque de sensibilité et seuls 50 % des béliers infectés par *B. ovis* présentent une épididymite (2). De plus, ce diagnostic clinique est très peu spécifique, car autres bactéries peuvent induire une épididymite clinique. Les bactéries les plus fréquemment rapportées comme étant à l'origine d'épididymite du bélier comprennent *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus* spp., *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, *B. melitensis* et *Chlamydia abortus* (précédemment *Chlamydia psittaci*) (5, 6, 9, 11, 13, 25, 31, 34). De plus, les lésions épididymaires sont souvent, chez le bélier, des granulomes stériles liés à des traumatismes.

Bien qu'une susceptibilité à *B. ovis* ait été démontrée expérimentalement chez les bovins, les caprins et les cervidés, des cas naturels n'ont été rapportés que chez les cervidés (21). À ce jour, aucun cas humain n'a été rapporté et *B. ovis* n'est pas considéré comme un agent de zoonose. Cependant, dans les zones où l'infection à *B. melitensis* coexiste avec *B. ovis*, des précautions particulières doivent être prises pour la manipulation des prélèvements, qui doivent être transportés vers le laboratoire en conteneurs étanches (pour plus de détails voir le Chapitre 2.4.3., « Brucellose bovine »).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

a) Collecte des prélèvements

Les prélèvements de choix pour l'isolement de *B. ovis* à partir d'animaux vivants sont le sperme, les écouvillonnages vaginaux et le lait (voir les préconisations données au Chapitre 2.7.2., « Brucellose ovine et caprine [Infection à *B. ovis* exclue] »). Le sperme (sécrétions génitales) peut être collecté aisément par écouvillonnage de la cavité prépucciale après électro-éjaculation. Si on ne possède pas d'électro-éjaculateur, il est possible d'écouvillonner le vagin d'une brebis indemne de brucellose après saillie naturelle.

En ce qui concerne l'isolement de *B. ovis* après autopsie, les prélèvements optimaux en termes de probabilité d'isolement sont les épididymes, les vésicules séminales, les ampoules déférentielles ainsi que les nœuds lymphatiques inguinaux chez le bélier et l'utérus et les nœuds lymphatiques iliaques et supramammaires chez la brebis. Cependant, une sensibilité maximale est obtenue avec une recherche complète incluant également d'autres organes et nœuds lymphatiques (rate, nœuds lymphatiques céphaliques, scapulaires, préfémoraux et testiculaires). Les agneaux morts et le placenta doivent aussi être examinés. Les sites préférentiels pour les avortons ou les agneaux mort-nés sont le contenu de l'estomac et le poumon.

Les échantillons destinés à la culture doivent être réfrigérés et expédiés au laboratoire pour une mise en culture aussi rapide que possible après prélèvement. La bactérie demeure viable au moins 72 h à température ambiante et sa survie est améliorée à 4 °C ou mieux par congélation des échantillons.

b) Méthodes de coloration

L'examen du sperme et des sécrétions vaginales est possible après coloration par la méthode de Stamp (1, 8) (voir le Chapitre 2.7.2.), des coccobacilles caractéristiques pouvant être mis en évidence chez de nombreux animaux infectés (32). L'examen de frottis colorés par la méthode de Stamp à partir de tissus suspects (tractus génital mâle, nœuds lymphatiques inguinaux, placentas, contenu stomacal et poumon du fœtus) permet également un diagnostic présumptif rapide.

Cependant, d'autres bactéries de morphologie ou de coloration similaire (*B. melitensis*, *Coxiella burnetii*, et *Chlamydia abortus*) peuvent également être présentes dans de tels échantillons, compliquant ainsi le

1 En système de production semi-extensif (le plus commun dans les pays d'Europe méditerranéenne) les béliers sont généralement entretenus ensemble. La transmission entre béliers hors saison de reproduction est assez fréquente et on pense qu'elle peut se produire selon plusieurs voies, notamment via la muqueuse rectale. Cependant, la voie orale est la voie privilégiée de la transmission entre béliers. Les béliers établissent entre eux une hiérarchie (combats tête contre tête) et il n'est pas rare que les béliers dominés, une fois matés par les béliers dominants, lèchent le prépuce de ces derniers en signe de soumission. Si ces béliers dominants sont infectés, la probabilité est forte que leur prépuce soit infecté (excrétion dans le sperme).

diagnostic pour le technicien inexpérimenté. Les résultats de la bactérioscopie devront donc toujours être confirmés par la culture.

c) Culture

La meilleure méthode de diagnostic direct est la culture bactériologique sur milieu approprié. Le sperme, les écouvillons vaginaux ou les échantillons de lait sont ensemencés directement sur les boîtes de milieu approprié et les boîtes sont incubées à 37 °C en atmosphère renfermant 5 à 10 % de CO₂. Les tissus doivent être macérés et broyés dans une petite quantité de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) en stomacher ou autre broyeur avant l'ensemencement.

La croissance apparaît habituellement après 3 à 4 jours, mais les boîtes de culture ne doivent pas être jetées avant 7 jours. Les colonies de *B. ovis* deviennent visibles (0,5 à 2,5 mm) après 3 à 4 jours d'incubation. Elles sont rugueuses, rondes, brillantes et convexes.

Brucella ovis peut être isolée sur milieux non sélectifs, tels que base pour gélose au sang (*blood agar base*) enrichie à 10 % en sérum stérile ovin ou bovin ou bien une gélose à 5-10 % de sang de mouton. Cependant, l'inoculum est souvent contaminé par d'autres bactéries qui peuvent dissimuler la croissance de *B. ovis*. Aussi, l'usage de milieux sélectifs est-il préféré. Plusieurs milieux sélectifs pour *B. ovis* ont été décrits. On recommande le milieu modifié de Thayer-Martin (4 15). Il peut être préparé avec une base de milieu GC (*GC medium base* – 38 g/litre ; Biolife, Milan, Italie) supplémentée en hémoglobine (10 g/litre ; Difco) et en méthanesulfonate de colistine (7,5 mg/litre), vancomycine (3 mg/litre), nitrofurantoïne (10 mg/litre), nystatine (100 000 Unités Internationales [UI]/litre = 17,7 mg) et amphotéricine B (2,5 mg/litre) (tous ces produits chez Sigma Chemicals, St Louis, États-Unis d'Amérique [USA]). Les solutions de travail sont préparées comme suit :

Solution A : ajouter 500 ml d'eau distillée à la base de milieu GC, chauffer la pâte soigneusement en agitant en continu et autoclaver à 120 °C pendant 20 min.

Solution B : dissoudre l'hémoglobine dans 500 ml d'eau distillée, en ajoutant l'eau doucement pour éviter les grumeaux. Une fois la dissolution obtenue, placer sur agitateur magnétique puis autoclaver à 120 °C pendant 20 min.

Solution antibiotique (préparée quotidiennement) : la colistine, la nystatine et la vancomycine sont dissoutes dans un mélange méthanol/eau (1/1) ; la nitrofurantoïne est dissoute dans 1 ml de solution NaOH 0,1 M stérile. Pour l'amphotéricine B, on recommande de préparer une solution stock de 10 mg/ml d'amphotéricine B en dissolvant en premier lieu 10 mg dans 1 ml de diméthyl-sulfoxyde stérile (C₂H₆OS, pour analyses ; ACS) remis ensuite dans 9 ml de PBS (10 mM, pH 7,2). Le reste de chaque solution stock peut être conservé quelques jours à 4 °C. Toutes les solutions antibiotiques sont filtrées au travers de filtres 0,22 µm avant addition au milieu de culture.

Une fois autoclavées, les solutions A et B sont stabilisées à une température de 45 à 50 °C et maintenues sous agitation. Les deux solutions sont mélangées (en ajoutant A à B) en évitant la formation de bulles. Les solutions antibiotiques sont ensuite ajoutées avec précautions au mélange maintenu sous agitation. Le tout est réparti ensuite en boîtes de Petri.

Une fois préparées, les boîtes ne doivent pas être conservées trop longtemps. Des milieux fraîchement préparés sont toujours préférables. Ce milieu permet également l'isolement de *B. melitensis* (voir le Chapitre 2.7.2.).

Tous les milieux de culture doivent être soumis à un contrôle de qualité avec la souche de référence, de manière à démontrer leur fertilité.

Une autre combinaison antibiotique comprenant vancomycine (3 mg/litre), colistine (7,5 mg/litre), nystatine (12 500 UI/litre) et nitrofurantoïne (10 mg/litre) est adéquate, mais moins efficace.

Le milieu de Farrell décrit pour la culture de brucelles en phase lisse n'est pas approprié pour la culture de *B. ovis* qui en général ne cultive pas dessus.

d) Identification et typage

Les colonies de *Brucella ovis* ne sont pas hémolytiques. Elles sont rondes, convexes, à bords réguliers et sont toujours du type rugueux (examen par transillumination oblique ou épreuve de l'acriflavine) (1, 8). Pour sa croissance, *Brucella ovis* nécessite une atmosphère avec 5 à 10 % de CO₂. Elle n'a pas d'activité uréasique, ne réduit pas les nitrates en nitrites, produit une catalase mais pas d'oxydase. Cette souche ne produit pas d'H₂S et, bien qu'elle ne pousse pas en présence de violet de méthyle, elle pousse

habituellement en présence de fuchsiine basique et de thionine. Les cultures ne sont pas lysées par les phages Tbilissi (Tb), Weybridge (Wb) et Izatnagar (Iz) à la dilution courante d'épreuve (DCE) ou à 10^4 DCE, mais elles sont lysées par le phage R/C (1,8). La plupart des laboratoires ne disposent pas de l'équipement permettant une identification complète et un protocole d'identification présomptif est alors nécessaire. La plupart des souches de *B. ovis* peuvent être correctement identifiées sur la base des caractéristiques culturales, de l'observation en transillumination oblique, des colorations de Gram ou de Stamp, de la catalase, de l'oxydase, de l'uréase et du test à l'acridine. Cependant, une identification définitive ne peut être effectuée que par des laboratoires ayant l'expérience de l'identification et du typage des *Brucella*.

Une épreuve d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), récemment mise au point, est un outil supplémentaire pour la détection et l'identification de *Brucella* spp (3, 14).

Une méthode d'électrophorèse en champs pulsés permet la différenciation entre *B. ovis* et les autres espèces de *Brucella* (19). De même, *B. ovis* peut être différenciée des autres espèces de *Brucella* par un examen en PCR suivi d'une analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PCR-RFLP), car elle montre un profil spécifique avec cette technique qui cible les gènes *omp2a*, *omp2b*, *omp25* et *omp31*, codant les principales protéines de membrane externe de toutes les espèces de *Brucella* (30). Une électrophorèse en champ pulsé peut aussi faire la distinction entre plusieurs sous-types de *Brucella ovis* (22).

2. Épreuves sérologiques

Les épreuves les plus efficaces et les plus largement utilisées sont la fixation du complément (FC), l'immunodiffusion en gélose (IDG) et la méthode immuno-enzymatique (ELISA). Plusieurs pays ont adopté des techniques de référence pour *B. ovis*, mais la seule épreuve prescrite par l'OIE et l'Union Européenne (UE) pour les échanges internationaux est la FC. Cependant, il a été démontré que l'IDG montre une sensibilité similaire à celle de la FC et est plus simple à réaliser. Bien que non encore normalisé, l'ELISA s'est avéré plus sensible et spécifique que la FC et l'IDG dans plusieurs études séparées. Il pourra devenir un candidat à la désignation comme épreuve prescrite pour le diagnostic de *B. ovis* dès que des études de validation et de normalisation auront été conduites.

Le sérum étalon (de référence) international anti-*Brucella ovis* (Standard international 1985²) sert au calibrage et à la normalisation de tous les autres étalons. Cet étalon est disponible auprès des laboratoires nationaux de référence et doit être utilisé pour établir des étalons nationaux secondaires qui serviront à préparer et tester les sérums de travail utilisés par les laboratoires dans les diagnostics de routine.

• Antigènes

Lorsque des *Brucella* rugueuses sont traitées à chaud en milieu salin (extrait HS pour « Hot Saline »), on peut récupérer des extraits hydrosolubles, composants majeurs qui précipitent en présence d'un sérum anti-*Brucella* rugueuse (10, 20). C'est pourquoi les extraits HS sont désignés comme « Antigène rugueux spécifique » ou lorsqu'ils sont obtenus à partir de *B. ovis*, comme « Antigène spécifique de *B. ovis* ». Cependant, la caractérisation chimique des extraits HS de *B. ovis* a montré qu'ils étaient riches en lipopolysaccharide rugueux (LPS-R), en protéines de membrane externe du groupe 3 et en autres composants de membrane externe (23). Ainsi, l'extrait HS renferme bien des déterminants spécifiques du LPS de *B. ovis*, mais aussi d'autres composants antigéniques, dont certains sont communs à *Brucella melitensis* rugueuse ou lisse et aux autres *Brucella* (26). De tels composants participent à la réactivité croisée parfois observée avec l'extrait HS sur des sérums de moutons infectés par *B. melitensis* ou vaccinés avec le Rev.1 (23). L'extrait HS, du fait de son hydrosolubilité et de son contenu important en épitopes de surface cellulaire, est le meilleur antigène de diagnostic et a été très largement utilisé pour le diagnostic sérologique de l'infection à *B. ovis*.

Pour la préparation des antigènes HS utilisables dans les épreuves sérologiques, il est recommandé d'utiliser la souche REO 198 de *Brucella ovis* qui est une souche CO_2 et sérum indépendante. Cette souche peut être obtenue auprès de l'INRA³. Les milieux solides décrits en Section B.1.c sont satisfaisants pour la culture de *B. ovis* REO 198. L'antigène HS est préparé comme suit :

- i) préparer une culture en phase exponentielle d'une souche de *B. ovis*, de préférence aérobique et non dépendante de sérum, par exemple la souche REO 198, d'une des manières suivantes : pendant 48 h en flacons de bouillon trypticase-soja sur un agitateur orbital à 37 °C et 150 tr/min ; ou en boîtes

2 Disponible auprès du Laboratoire de référence de l'OIE pour la Brucellose, VLA Weybridge, Addlestone, Surrey KT15 3NB, Royaume-Uni

3 Institut national de la recherche agronomique (INRA), Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, 37380 Nouzilly, France.

de Roux en gélose trypticase-soja ou autre milieu approprié, additionné de 5 % de sérum (non nécessaire avec la souche RE0 198) ; ou bien en fermenteur tel que décrit pour *B. abortus*, mais avec addition de 5 % de sérum au milieu (non nécessaire avec la souche RE0 198).

- ii) les cellules sont mises en suspension dans du soluté salin à 0,85 % ou du PBS, puis sont lavées deux fois dans du soluté salin à 0,85 % (12 g de cellules sèches ou 30 g de cellules humides en paquet dans 150 ml).
- iii) la suspension cellulaire est ensuite autoclavée à 120 °C pendant 15 à 30 min.
- iv) après refroidissement, la suspension est centrifugée (15 000 *g*, 4 °C, 15 min) et le surnageant est filtré puis dialysé contre l'eau distillée (100 fois le volume de la suspension) à 4 °C pendant au moins 2 jours, et l'eau devrait être changée au moins 3 fois.
- v) le liquide dialysé peut être ultracentrifugé (100 000 *g*, 4 °C, 6 à 8 h) et le culot est repris dans un petit volume d'eau distillée puis lyophilisé. L'utilisation de CPSRII (Control Process Serum Replacement II) avant la lyophilisation peut améliorer la stabilité et l'activité anti-complémentaire.

L'HS est ensuite repris en eau distillée (pour utilisation en IDG), en tampon véronal (pour utilisation en FC), ou en tampon carbonate/bicarbonate ou PBS (pour utilisation en ELISA) puis titré contre un panel adéquat de sérums positifs et négatifs.

L'HS en solution est conservé à 4 °C en présence de conservateur constitué par 0,5 % de phénol (seulement pour l'IDG) ou lyophilisé. Congélation et décongélation doivent être évitées (10). L'antigène de FC doit être normalisé contre le Sérum étalon international anti-*B. ovis* de manière à produire 50 % de fixation à la dilution du 1/100.

a) Test de fixation du complément (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Il n'existe pas de procédure normalisée pour la FC, mais la microméthode est plus pratique. La fixation à froid apparaît plus sensible que la fixation à chaud (7, 24, 27) mais est moins spécifique. Des réactions anti-complémentaires, fréquentes avec les sérums ovins, sont néanmoins plus fréquentes avec la fixation à froid.

Plusieurs méthodes ont été proposées pour la FC, qui utilisent différentes concentrations d'hématies fraîches de mouton (GRM pour Globules Rouges de Mouton) (une suspension de 2 à 3 % est habituellement recommandée) sensibilisées avec un volume égal de sérum de lapin anti-GRM dilué pour contenir plusieurs fois (en général 2 à 5 fois) la concentration minimale nécessaire à la lyse de 100 % des GRM en présence d'une solution titrée de complément de cobaye. Cette dernière est titrée indépendamment (en présence ou en absence d'antigène selon la technique) de manière à établir la quantité de complément nécessaire à la lyse de 50 % ou 100 % des GRM sensibilisés par unité de volume d'une suspension étalonnée ; cette quantité est définie comme l'unité hémolytique de complément 50 ou 100 % respectivement (CH₅₀ ou CH₁₀₀). Il est habituellement recommandé de titrer le complément avant chaque série d'épreuves, la détermination des unités CH₅₀ nécessitant une technique en tubes. En général, on utilise 1,25 à 2 unités CH₁₀₀ ou 5 à 6 unités CH₅₀ dans l'épreuve.

Le diluant utilisé pour la FC est le tampon véronal (TV). Celui-ci est préparé à partir de tablettes disponibles dans le commerce ou bien préparées selon une formule décrite par ailleurs (voir le Chapitre 2.4.3.). Les sérums à tester sont inactivés pendant 30 min en bain-marie entre 60 et 63 °C puis dilués (dilutions sériées de raison 2) en TV. La solution stock d'antigène HS (2,5 à 20 mg/ml) est diluée en TV après un titrage préalable (titrage en échiquier). Habituellement, une seule dilution sérique est testée (en général le 1/10).

La technique en microplaque de 96 puits à fond rond est habituellement mise en œuvre de la façon suivante :

- i) on dépose 25 µl d'échantillon de sérum dilué inactivé dans la 1^{ère} et la 2^e rangées. 25 µl de TV sont ajoutés à tous les puits excepté ceux de la première rangée. Des dilutions en série de rang 2 sont effectuées par transfert de 25 µl de sérum dilué de puits en puits à partir de la seconde rangée ;
- ii) on dépose ensuite 25 µl d'antigène, à la dilution de travail, dans chaque puits sauf ceux de la première rangée ;
- iii) on ajoute enfin 25 µl de complément, contenant le nombre requis d'unités, à tous les puits ;
- iv) des puits témoins contenant seulement le diluant, le complément + le diluant, l'antigène + le complément + le diluant, sont préparés sous un volume de 75 µl pour chaque série d'épreuves. Un sérum témoin faiblement positif doit être inclus dans chaque série d'épreuves pour vérifier la sensibilité de la série ;

- v) les plaques sont incubées 30 min à 37 °C ou la nuit à 4 °C, et un volume (de 25 ou 50 µl selon la technique) de GRM sensibilisés est ajouté dans chaque puits. Les plaques sont remises à incuber 30 min à 37 °C ;
- vi) la lecture s'effectue après centrifugation des plaques à 1 000 *g* et 4 °C pendant 10 min ou après les avoir laissées au repos à 4 °C pendant 2 à 3 h pour permettre aux cellules de sédimenter. Le degré d'hémolyse est comparé à celui de puits témoins correspondant à 0, 25, 50, 75 et 100 % d'hémolyse. L'absence d'activité anticomplémentaire est vérifiée pour chaque sérum dans le puits de la première rangée. Le titre du sérum est donné par la plus forte dilution donnant 50 % ou plus d'inhibition de l'hémolyse.

- **Normalisation des résultats du test de FC**

Il existe un système d'unités fondé sur le Sérum étalon international anti-*B. ovis* (International Standard 1985 [cf. note de bas de page 2]). Ce sérum contient 1 000 UIFC/ml. Si, par exemple, avec une méthode donnée, ce sérum montre un titre de 200, alors, pour un sérum inconnu testé par la même méthode, le nombre d'UIFC par ml est donné par la formule : $1\ 000 \times 1/200 \times \text{titre du sérum testé}$. Il est recommandé que dans chaque pays utilisant la FC un agrément soit trouvé entre les différents laboratoires pour qu'ils utilisent la même méthode de FC, de manière à garantir le même niveau de sensibilité et de spécificité vis-à-vis d'un panel adéquat de sérums de moutons positifs en culture de *B. ovis* et de moutons indemnes de *Brucella*. Les résultats doivent toujours être exprimés en UIFC, calculés par référence à un sérum étalon, lui-même calibré par rapport à l'étalon international.

Interprétation des résultats : les sérums présentant un titre égal à 50 UIFC/ml ou plus sont considérés comme positifs dans l'UE.

b) Épreuve d'immunodiffusion en gélose

L'épreuve d'IDG (2) utilise les réactifs suivants : de l'Agar Noble de bonne qualité ou de l'agarose, du chlorure de sodium (NaCl) et un tampon borate (préparé avec de l'acide borique [12,4 g] ; du chlorure de potassium [14,5 g] ; de l'eau distillée [1 600 ml] ; ajusté à pH 8,3 avec une solution de NaOH 0,2 M et complété à 2 000 ml avec de l'eau distillée).

Pour préparer les gels, dissoudre 1 g d'agarose (ou d'Agar noble), 10 g de NaCl et 100 ml de tampon borate par ébullition sous agitation continue. Sur une surface plane, recouvrir des lames de verre propres avec la quantité ad hoc de gel pour obtenir une couche d'une épaisseur de 2,5 mm (3,5 ml approximativement pour des lames porte-objet standards). Une fois le gel solidifié (15 à 20 min), des puits sont découpés au moyen d'un emporte-pièce pour gel. Les puits doivent avoir 3 mm de diamètre et être espacés de 3 mm. Ils doivent être disposés selon un format hexagonal autour d'un puits central de 3 mm de diamètre également. L'épreuve peut être adaptée en boîte de Petri et selon un autre schéma.

Les sérums à examiner sont placés dans les puits en alternant un puits sur deux avec un sérum positif (infection prouvée par bactériologie), l'antigène étant déposé à la concentration optimale dans le puits central. Les résultats sont lus après incubation de 24 et 48 h à température ambiante en chambre humide. Une réaction positive se traduit par une ligne précise de précipitation entre le puits central et les puits tests, avec une identité complète ou partielle avec celle des témoins positifs. Des lignes de précipitation ne donnant pas une identité totale peuvent également apparaître et correspondent à des composants antigéniques mineurs de l'antigène HS (les anticorps dirigés contre ces composants peuvent aussi être courants dans les infections à *B. melitensis*). Ces réactions doivent aussi être considérées comme positives. Avant une lecture définitive, il est important de laver les lames pendant 1 h dans une solution de citrate de sodium à 5 % sodium pour éliminer les lignes de précipitation non spécifiques.

L'antigène utilisé dans l'IDG est l'antigène HS (2,5 à 20 mg/ml) dilué en eau distillée et contenant 0,5 % de phénol comme conservateur (cet antigène peut être conservé à 4 °C pendant 1 mois au moins). Des dilutions de l'antigène sont testées avec un panel de 20 à 30 sérums de bœufs naturellement infectés par *B. ovis* et avec un panel provenant de bœufs indemnes de *Brucella*. La concentration optimale de l'antigène est celle qui donne la ligne de précipitation la plus nette avec tous les sérums de bœufs infectés tout en donnant des résultats négatifs avec les sérums de bœufs indemnes.

c) Méthode immuno-enzymatique

Plusieurs variantes de cette méthode ont été proposées. La méthode décrite ici est un ELISA indirect utilisant de l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis-[3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique]) comme chromogène, mais d'autres protocoles conviennent également. Les tests sont réalisés en plaques de 96 puits à fond plat. Les dilutions de réactifs et de sérum sont faites en PBS, de pH 7,2, additionné de Tween 20 à 0,05 % (PBST). Les dilutions d'antigène sont effectuées en tampon carbonate/bicarbonate, de pH 9,6 ou en PBS, de pH 7,2. Les plaques sont lavées après l'adsorption de l'antigène et entre les incubations, en général avec le PBST.

L'antigène (HS) et le conjugué font l'objet d'un titrage en échiquier et les dilutions appropriées sont sélectionnées pour obtenir la meilleure discrimination entre les résultats de sérums témoins positifs et négatifs. Les anticorps secondaires (anti-IgG ovine [chaînes H+L]) sont habituellement conjugués à la peroxydase de raifort (HRPO), bien que d'autres enzymes ou conjugués (tels que la protéine recombinante G/HRPO) puissent être utilisés. Un conjugué anticorps monoclonal anti-IgG₁ bovine s'est avéré utilisable dans cet ELISA (29). Si le conjugué à la peroxydase est utilisé, le chromogène, habituellement l'ABTS, est dilué dans un tampon substrat (composé de citrate trisodique et d'acide citrique, de pH 4). Le substrat, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) y est ajouté et les plaques sont incubées pendant 15 à 25 min à température ambiante. La réaction peut être arrêtée avec de l'azide de sodium 1 mM et la modification de couleur est mesurée à 405-414 nm (pour plus de détails voir le Chapitre 2.4.3.).

L'antigène utilisé dans l'ELISA est le HS en solution stock à 1 mg/ml en tampon d'adsorption, calibré par titrage en échiquier, avec différentes dilutions d'antigène, de conjugué et de substrat, vis-à-vis d'un sérum étalon ou de dilutions d'un panel de sérum de moutons à culture positive en *B. ovis* et de moutons indemnes de *Brucella* afin de déterminer la concentration la plus sensible et la plus spécifique (habituellement 5 à 10 µg/ml).

- **Protocole (exemple)**

- i) On dépose 100 µl d'une dilution prédéterminée d'antigène en tampon carbonate de pH 9,6 dans chaque puits de microplaques en polystyrène de qualité et les plaques sont incubées 2 h à 37 °C. On peut aussi sensibiliser les plaques en utilisant des dilutions d'antigène en PBS de pH 7,2 (100 µl/puits) et en incubant une nuit à 4 °C. Les plaques sont ensuite lavées 4 fois pour éliminer l'antigène non adsorbé puis séchées en les tapant fermement à l'envers sur un papier absorbant. Les plaques peuvent être utilisées immédiatement ou séchées et conservées à 4 °C (la stabilité dans ces conditions est correcte pour au moins 1 mois).
- ii) *Sérums* : diluer les sérums à tester et les sérums témoin positif et négatif au 1/200 (au minimum 10 µl de sérum pour 2 ml de PBST). Cette dilution est habituellement optimale avec des conjugués poly- ou monoclonaux. Cependant, des dilutions au 1/50 sont nécessaires avec un conjugué à base de peroxydase et de protéine G (16). Déposer 100 µl de sérum par puits en double dans les plaques. Les plaques sont couvertes et incubées 1 h à 37 °C puis lavées 3 fois en tampon de lavage PBST.
- iii) *Conjugué* : le conjugué titré est dilué en PBST et déposé sous 100 µl dans les puits. Les plaques sont couvertes et incubées 1 h à 37 °C. Après incubation, les plaques sont lavées une nouvelle fois à 3 reprises avec le PBST.
- iv) *Substrat* : la solution d'ABTS en tampon substrat est déposée (100 µl par puits) et les plaques sont incubées 15 à 60 min à température ambiante sous agitation continue.
- v) *Lecture et interprétation des résultats* : la densité optique (DO) est mesurée automatiquement dans un spectrophotomètre à 405-414 nm. Les valeurs de DO sont transformées en pourcentages par rapport à la moyenne des DO obtenues pour le témoin positif ou, mieux, transformées en unités ELISA calculées soit manuellement soit à l'ordinateur avec un programme de lissage de courbe (curve-fitting) à partir d'une courbe étalon établie à partir des résultats d'une série de dilutions du témoin positif. Le seuil de positivité doit être calculé en testant une quantité suffisamment importante de sérums de moutons indemnes de *Brucella*, la sensibilité du test étant appréciée sur une collection appropriée de sérums d'animaux positifs en culture pour *B. ovis*.

Le seuil de coupure doit être parfaitement établi grâce aux techniques de validation appropriées (voir Chapitre 1.1.4., « Principes de validation des méthodes de diagnostic des maladies infectieuses ») et en utilisant une série de sérums adéquate provenant d'animaux démontrés infectés par *Brucella* en culture, ou d'animaux prouvés indemnes. L'étalon international anti-*Brucella ovis* ou l'étalon secondaire correspondant ou l'étalon national doivent être utilisés pour contrôler et valider la méthode de diagnostic en question.

Des études comparatives ont montré que l'ELISA est plus sensible que l'IDG ou la FC (18, 24, 28, 35, 36). La combinaison de l'IDG et de l'ELISA donne une sensibilité optimale car il existe des sérums négatifs en ELISA et positifs en IDG (18). Cependant la combinaison de la FC et de l'ELISA ou de la FC et de l'IDG n'est pas plus sensible que l'ELISA utilisé seul (18). De plus la FC présente d'importants inconvénients du fait de sa complexité de réalisation, de la nécessité d'inactiver les sérums, de l'activité anti-complémentaire de certains sérums, de la difficulté de réalisation avec des sérums hémolysés et de la possibilité de phénomène de zone. L'IDG est quant à elle une épreuve sensible, simple et d'interprétation aisée. Elle est donc très pratique pour le diagnostic de routine en laboratoire non spécialisé.

On connaît peu de choses sur l'existence de réactions faussement positives liées à des infections par des bactéries croisant au plan antigénique en sérologie *B. ovis*. L'agent du piétin (*Dichelobacter nodosus*) a été

décrit comme croisant avec *B. ovis* (33), mais l'importance et les conséquences pratiques de cette réactivité croisée dans le diagnostic de l'infection à *B. ovis* sont inconnues⁴.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

La vaccination est probablement le moyen le plus économique et le plus pratique pour un contrôle à moyen terme de l'infection à *B. ovis* dans les zones de forte prévalence. Pour un contrôle à long terme, on doit prendre en compte l'effet de la vaccination sur le dépistage sérologique et des programmes de qualification par rapport à l'infection à *B. ovis* doivent être mis en place. La souche vaccinale vivante Rev.1 de *B. melitensis* (voir le Chapitre 2.7.2.) est probablement le meilleur vaccin disponible pour la prévention de l'infection à *B. ovis* (2). Une dose normale unique (10⁹ UFC) de Rev.1 administrée par voie sous-cutanée (sous un volume de 1 ml) ou par voie conjonctivale (sous un volume de 25 à 30 µl) aux béliers âgés de 3 à 5 mois confère une immunité adéquate contre *B. ovis*. La vaccination conjonctivale présente l'avantage de minimiser la réponse sérologique intense et de longue durée provoquée par la vaccination sous-cutanée, améliorant en conséquence la spécificité des épreuves sérologiques (2). Lorsqu'il est utilisé chez les jeunes animaux, le vaccin Rev.1 présente une innocuité suffisante et les effets secondaires sont rares. Cependant, on dispose de peu d'informations concernant l'innocuité du vaccin Rev.1 lorsqu'il est utilisé chez le bélier adulte. Une étude a montré que la vaccination sous-cutanée ou conjonctivale de béliers âgés de 12 à 13 mois n'induisait pas d'effet indésirable et protégeait les béliers contre *B. ovis* (réf. 17 et J.M. Blasco, communication personnelle). Par conséquent, dans les pays à système d'élevage extensif et à fort niveau d'incidence, il pourrait être intéressant de vacciner à la fois les béliers sains jeunes et adultes. Dans les pays infectés par *B. ovis* mais indemnes de *B. melitensis*. Il conviendrait de faire attention aux séquelles sérologiques possibles avant d'utiliser le vaccin Rev.1 contre *B. ovis*, et la voie conjonctivale devrait être préférée. Le vaccin vivant RB51 (*B. abortus*) n'a, quant à lui, pas démontré son efficacité contre l'infection ovine à *B. ovis* (12) et aucun vaccin de remplacement n'est actuellement disponible.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D. & VERGER J.M. (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA, Paris, France.
2. BLASCO J.M. (1990). *Brucella ovis*. In: Animal Brucellosis, Nielsen K. & Duncan J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 351–378.
3. BRICKER B.J. (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis, *Vet. Microbiol.*, **90**, 435–446.
4. BROWN G.M., RANGER C.R. & KELLEY D.J. (1971). Selective media for the isolation of *Brucella ovis*. *Cornell Vet.*, **61**, 265–280.
5. BULGIN M.S. & ANDERSON B.C. (1983). Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **182**, 372–374.
6. BURGESS G.W. & McDOWELL J.W. (1981). *Escherichia coli* epididymitis and seminal vesiculitis in a ram. *Aust. Vet. J.*, **57**, 479–480.
7. BURGESS G.W. & NORRIS M.J. (1982). Evaluation of the cold complement fixation test for diagnosis of ovine brucellosis. *Aust. Vet. J.*, **59**, 23–25.
8. CORBEL M.J., GILL K.P.W. & THOMAS E.L. (1978). Methods for the identification of *Brucella*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, UK, ADAS, RCV 22.
9. DE LONG W.J., WALDHAM D.G. & HALL R.F. (1979). Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and eastern Oregon flocks. *Am. J. Vet. Res.*, **40**, 101–102.
10. DIAZ R. & BOSSERAY N. (1973). Identification d'un composé antigénique spécifique de la phase rugueuse (R) des *Brucella*. *Ann. Rech. Vet.*, **4**, 283–292.

4 *Arcanobacterium pyogenes* et *Corynebacterium ovis*, dont les extraits solubles présentent des réactions croisées avec les sérums positifs dirigés contre *B. ovis* ont été récemment isolés de plusieurs noeuds lymphatiques de béliers et donnent des réponses fortement positives en IDG et i-ELISA (J.M. Blasco, résultats non publiés).

11. EKDAHL M.O., MONEY D.F. & MARTIN C.A. (1968). Some aspects of epididymitis of rams in New Zealand. *N. Z. Vet. J.*, **16**, 81–82.
12. JIMENEZ DE BAGUES M.P., BARBERAN M., MARIN C.M. & BLASCO J.M. (1995). The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, **13**, 301–304.
13. LIVINGSTONE C.W. & HARDY W.T. (1964). Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. *Am. J. Vet. Res.*, **25**, 660–663.
14. MANTEROLA L., TEJERO-GARCÉS A., FICAPAL A., SHOPAYEVA G., BLASCO J.M., MARIN C.M. & LÓPEZ-GOÑI I. (2003). Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet. Microbiol.*, **92**, 65–72.
15. MARIN C.M., ALABART J.L. & BLASCO J.M. (1996). Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 426–428.
16. MARIN C.M., ALONSO-URMENETA B., MORIYON I., PEREZ S. & BLASCO J.M. (1998). Comparison of polyclonal, monoclonal and protein G peroxidase conjugates in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Vet. Rec.*, **143**, 390–394.
17. MARIN C.M., BARBERAN M., JIMENEZ DE BAGUES M.P. & BLASCO J.M. (1990). Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev. 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Res. Vet. Sci.*, **48**, 209–215.
18. MARIN C.M., JIMENEZ DE BAGUES M.P., BLASCO J.M., GAMAZO C., MORIYON I. & DIAZ R. (1989). Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet. Rec.*, **125**, 504–508.
19. MICHAUX-CHARACHON S., BOURG G., JUMAS-BILAK E., GUIGUE-TALET P., ALLARDET-SERVENT A., O'CALLAHAN D. & RAMUZ M. (1997). Genome structure and phylogeny in genus *Brucella*. *J. Bacteriol.*, **179**, 3244–3249.
20. MYERS D.M., JONES L.M. & VARELA-DIAZ V. (1972). Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. *Appl. Microbiol.*, **23**, 894–902.
21. RIDLER A. (2001) *Brucella ovis* infection in deer. *Surveillance*, **28** (3), 6–8.
22. RIDLER L., LEYLAND M.J., FENWICK S.G. & WEST D.M. (2005). Demonstration of polymorphism among *Brucella ovis* field isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.*, **108**, 69–74.
23. RIEZU-BOJ J.I., MORIYON I., BLASCO J.M., MARIN C.M. & DIAZ R. (1986). Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 938–942.
24. RIS D.R., HAMEL K.L. & LONG D.L. (1984). Comparison of an enzyme-linked immunospecific assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. *N. Z. Vet. J.*, **32**, 18–20.
25. RODOLAKIS A. & BERNARD K. (1977). Isolement de *Chlamydia* des organes génitaux de béliers atteints d'épididymite. *Bull. Acad. Vet. Fr.*, **50**, 65–70.
26. SANTOS J.M., VERSTREATE D.R., PERERA V.Y. & WINTER A.J. (1984). Outer membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species. *Infect. Immun.*, **46**, 188–194.
27. SEARSON J.E. (1982). Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation tests for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. Vet. J.*, **58**, 5–7.
28. SPENCER T.L. & BURGESS G.W. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. *Res. Vet. Sci.*, **36**, 194–198.
29. VIGLIOCCO A.M., SILVA PAULO P.S., MESTRE J., BRIONES G.C., DRAGHI G., TOSSI M. & NIELSEN K. (1997). Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.*, **54**, 357–368.

30. VIZCAINO N., CLOECKAERT A., VERGER J.M., GRAYON M. & FERNANDEZ L. (2000). DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes Infect.*, **2**, 1089–1100.
31. WEBB R.F. (1983). Clinical findings and pathological changes in *Histophilus ovis* infections of sheep. *Res. Vet. Sci.*, **35**, 30–34.
32. WEBB R.F., QUINN C.A., COCKRAM F.A. & HUSBAND A.J. (1980). Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. Vet. J.*, **56**, 172–175.
33. WHITINGTON R.J., SAUNDERS V.F. & EGERTON J.R. (1996). Antigenic cross-reactions between the causative agent of ovine footrot, *Dichelobacter nodosus*, and other bacteria. *Small Rumin. Res.*, **22**, 55–67.
34. WILLIAMSON P. & NAIRN M.E. (1980). Lesions caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the scrotum of rams. *Aust. Vet. J.*, **56**, 496–498.
35. WORTHINGTON R.W., STEVENSON B.J. & DE LISLE G.W. (1985). Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. *N.Z. Vet. J.*, **33**, 84–86.
36. WORTHINGTON R.W., WEDDELL W. & PENROSE M.E. (1984). A comparison of three serological tests for the diagnosis of *B. ovis* infection in rams. *N.Z. Vet. J.*, **32**, 58–60.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour l'épididymite contagieuse ovine (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).

ADÉNOMATOSE PULMONAIRE OVINE (adénocarcinome)

RÉSUMÉ

L'adénomatose pulmonaire ovine (OPA pour Ovine Pulmonary Adenocarcinoma), également connue sous le nom d'adénocarcinome pulmonaire ovin, ou jaagsiekte, est une tumeur contagieuse des moutons et, rarement, des chèvres. C'est une maladie respiratoire progressive, affectant principalement les animaux adultes. La maladie se manifeste dans de nombreuses régions du monde. Il a été démontré qu'un bêta-rétrovirus est responsable de la maladie : le jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV) qui est distinct des lentivirus ovins non-oncogènes.

Identification de l'agent pathogène : *le JSRV ne peut pas encore être cultivé in vitro, c'est pourquoi les méthodes de diagnostic classiques, comme l'isolement viral, ne sont pas utilisables pour le diagnostic. À l'heure actuelle, le diagnostic repose sur l'historique et l'examen clinique, de même que sur les examens pratiqués après autopsie, sur l'histopathologie et l'immunohistochimie. L'ADN ou l'ARN viral peuvent être détectés dans la tumeur, les nœuds lymphatiques de drainage, et les cellules mononucléées du sang périphérique, au moyen de la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR). Les agneaux s'infectent très jeunes avec le JSRV et, dans un troupeau infecté par l'OPA, la plupart des moutons sont infectés.*

Épreuves sérologiques : *on ne détecte pas, chez les moutons infectés, d'anticorps dirigés contre le rétrovirus et, de ce fait, les épreuves sérologiques ne peuvent être utilisées pour le diagnostic.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *il n'y a ni vaccins ni réactifs biologiques disponibles.*

A. INTRODUCTION

L'adénomatose pulmonaire ovine (OPA pour *Ovine Pulmonary Adenocarcinoma*), également connue sous l'appellation d'adénocarcinome pulmonaire ovin, jaagsiekte (en Afrikaans = maladie des déplacements) et carcinome pulmonaire ovin (OPC pour *Ovine Pulmonary Carcinoma*), est une tumeur contagieuse des poumons des moutons et, dans une moindre mesure, des chèvres. C'est la plus commune des tumeurs pulmonaires du mouton, elle est signalée dans de nombreux pays du monde. L'Australie et la Nouvelle-Zélande en sont indemnes, et elle a été éradiquée d'Islande.

Un certain nombre de virus différents ont été incriminés dans l'étiologie de l'OPA, dont un herpès virus et des lentivirus qui s'étaient multipliés à partir de tissu tumoral. Cependant, le premier (herpès virus) n'a pas de rôle étiologique dans l'OPA et les autres (lentivirus) ont les caractères des lentivirus non oncogènes. On a pu démontrer clairement que l'OPA est causée par un bêta-rétrovirus, qui ne peut pas encore être cultivé *in vitro* ; cependant ce virus a été cloné et séquencé. L'abréviation JSRV (pour jaagsiekte sheep retrovirus) est couramment utilisée pour désigner ce virus.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Actuellement, le diagnostic d'OPA repose sur des investigations cliniques et pathologiques, bien que la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) offre des possibilités pour un diagnostic *ante mortem* au niveau du troupeau. Dans les troupeaux où la maladie est suspectée, sa présence doit être, au moins une fois, confirmée par l'examen histopathologique du tissu pulmonaire atteint. Pour un tel examen, il est impératif de partir d'échantillons issus de plusieurs localisations affectées et, si possible, provenant de plus d'un animal. En effet, une pneumonie secondaire bactérienne, pouvant être la cause immédiate de la mort, masque souvent les lésions

(à la fois macro et microscopiques) de la maladie primaire. En absence d'épreuves sérologiques spécifiques, pouvant être utilisées pour diagnostiquer l'OPA sur l'animal vivant, le contrôle de la maladie repose sur des inspections régulières des troupeaux et sur une élimination rapide des cas suspects, ainsi que de leur descendance s'il s'agit de brebis.

1. Identification de l'agent pathogène

Bien que l'herpès virus ovin 1 (OvHV-1) n'ait été isolé exclusivement que de tumeurs d'OPA, ni les études épidémiologiques ni les infections expérimentales n'ont pu apporter la preuve de son rôle dans l'étiologie de l'OPA. L'herpès virus ovin 2 (OvHV-2) est l'herpès virus responsable de la fièvre catarrhale maligne du mouton et n'a jamais été relié à l'OPA.

L'existence de rétrovirus associés à l'OPA est reconnue depuis plusieurs années. Des lentivirus ovins ont été isolés à maintes occasions, mais ces virus n'ont pas de rôle étiologique dans l'OPA.

Pendant de nombreuses années, l'impossibilité de cultiver le JSRV, et l'absence d'anticorps anti-virus chez les moutons atteints, ont empêché de confirmer que ce virus est bien l'agent étiologique. Cependant, les techniques de biologie moléculaire ont apporté un progrès décisif, en particulier le clonage et le séquençage du génome de 7,5 kb de JSRV, après purification des virions à partir de lavages pulmonaires de moutons naturellement infectés (23). Le JSRV a été classifié comme un bêta-rétrovirus en raison de son organisation génétique et de ses protéines de structure. Bien que les gènes clonés du JSRV, utilisés comme sondes en hybridation, aient révélé une gamme de séquences endogènes homologues dans le génome de moutons à la fois sains et atteints d'OPA (1, 9, 23), Le JSRV est clairement exogène et associé exclusivement à l'OPA (13). Le JSRV est détecté de façon constante dans le liquide pulmonaire, la tumeur, les cellules mononuclées du sang périphérique et les tissus lymphoïdes des moutons atteints d'OPA, et des partenaires au contact sans signe clinique ; ce virus n'a jamais été détecté chez les moutons de troupeaux non atteints ou sans historique de tumeur. Des clones proviraux entiers du JSRV ont été obtenus à partir d'ADN de tumeur d'OPA. Les particules de virus JSRV, préparées à partir de ces clones par transfection provisoire d'une lignée cellulaire, ont été utilisées pour l'inoculation intra-trachéale d'agneaux nouveau-nés. Une tumeur d'OPA a été induite chez des agneaux, démontrant ainsi que le JSRV est l'agent causal de l'OPA (6, 15).

Le génome du mouton contient de nombreuses copies des séquences endogènes virales qui sont étroitement apparentées au JSRV. Bien qu'elles ne soient pas impliquées dans l'étiologie de l'OPA, l'expression de ces séquences chez le fœtus pourrait, en induisant une tolérance, jouer un rôle dans l'absence apparente de réponse immunitaire de la part des animaux adultes envers le JSRV exogène (14).

a) Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques

Le séquençage du JSRV et l'analyse des séquences endogènes du génome des moutons ont permis de développer des techniques PCR détectant spécifiquement le JSRV (1, 13). À l'aide de cette méthode très sensible, le JSRV a été détecté dans les cellules mononuclées du sang périphérique de moutons sans signes cliniques provenant de troupeaux atteints d'OPA, aussi bien qu'à partir d'agneaux expérimentalement infectés (5, 7, 10), et d'échantillons de lavage broncho-alvéolaire de moutons non infectés mais au contact (22). Des études longitudinales sur des troupeaux infectés par l'OPA ont démontré que les agneaux s'infectent très jeunes. Un pourcentage important des animaux de tels troupeaux est infecté bien que seulement une minorité d'entre eux développeront une OPA clinique (2, 16). Le JSRV a été retrouvé dans le colostrum et le lait des brebis de troupeaux infectés et le JSRV peut être détecté, dans les mois qui suivent, dans le sang des agneaux alimentés artificiellement avec ce colostrum ou ce lait (De las Heras *et al.* résultats non publiés).

• Contrôle et traitement

b) Inoculation à l'animal

L'OPA ne peut être transmise à aucun animal de laboratoire, mais peut être transmise au mouton avec du matériel contenant le JSRV, tel que des homogénats de tumeur, du liquide pulmonaire acellulaire concentré provenant de cas naturels d'OPA, ou des virus produits à partir de clones moléculaires. Après inoculation expérimentale de moutons adultes, la maladie clinique ne se développe qu'après plusieurs mois ou plusieurs années. En revanche, une infection par le JSRV est obtenue dans 100 % des cas lors d'inoculation similaire d'agneaux âgés de 1 à 6 mois, et une grande partie de ces agneaux développe une maladie clinique (62-90 %) et des lésions (87-100 %) (17).

Actuellement, il n'existe aucune méthode pratique d'inoculation à l'animal pour le diagnostic de l'OPA.

c) Isolement du virus

Il n'existe pas de système cellulaire permissif pour la propagation du JSRV. Quelques cultures cellulaires préparées à partir de tumeurs de jeunes agneaux peuvent permettre la réplication virale pendant une courte période de temps (11, 18).

d) Signes cliniques et pathologie

En absence actuellement de méthodes de laboratoire fiables pour le diagnostic *ante mortem* de l'OPA, l'étude de l'histoire du troupeau, des signes cliniques et l'examen des lésions post-mortem sont les éléments du diagnostic de base de la maladie. L'OPA ayant une longue période d'incubation, la maladie clinique est rencontrée le plus couramment chez des moutons de plus de 2 ans d'âge, avec un pic d'incidence à l'âge de 3 à 4 ans. Exceptionnellement, la maladie apparaît chez des animaux âgés de seulement 2 à 3 mois. Les signes prédominants sont ceux d'une gêne respiratoire progressive, particulièrement après déplacement ; la sévérité des signes reflète l'importance du développement de la tumeur dans les poumons. L'accumulation de liquide dans le tractus respiratoire est un signe prédominant de l'OPA, elle est à la cause des râles humides facilement détectés à l'auscultation. En soulevant l'arrière-train et en baissant la tête de la brebis malade, on peut causer l'écoulement d'un abondant liquide visqueux et écumeux par les naseaux. La toux et l'inappétence ne sont pas communes, mais, après l'installation des signes cliniques, la perte de poids est progressive et la phase terminale apparaît en quelques semaines ou en quelques mois. La mort est souvent accélérée en cas de complication par une pneumonie bactérienne, en particulier par l'infection à *Mannheimia* (autrefois *Pasteurella*) *haemolytica*. Chez les animaux cliniquement atteints, le diagnostic clinique peut être complété par une lymphopénie caractérisée par une diminution des lymphocytes T CD4+ et une neutrophilie correspondante, mais ces modifications ne sont pas pathognomoniques et ne sont pas détectées dans les phases précoces de l'infection expérimentale (20).

Dans quelques pays, on peut observer une autre forme d'OPA (l'OPA atypique) qui apparaît généralement comme une observation fortuite lors d'examens à l'autopsie ou à l'abattoir (4).

e) Autopsie

Les lésions de l'OPA sont dans la plupart des cas limitées aux poumons, bien qu'il puisse se produire une métastase intra et extra thoracique vers des nœuds lymphatiques ou d'autres tissus. Typiquement, les poumons affectés présentent, par rapport à la normale, une augmentation importante du volume et du poids, en raison de l'invasion massive du tissu pulmonaire par des lésions extensives à nodules grisâtres durs et confluents. Le plus souvent, les lésions sont présentes dans les deux poumons, bien que la surface atteinte de l'un ou de l'autre côté soit très variable. Les tumeurs sont fermes, de couleur grise à rosée, comme lustrées d'une brillance translucide et souvent séparées du poumon normal adjacent par une étroite zone emphysémateuse. La présence dans les conduits respiratoires d'un liquide blanc spumeux est un signe caractéristique que l'on retrouve nécessairement même dans des lésions très petites de quelques millimètres. Dans les cas avancés, ce liquide s'écoule de la trachée si elle est coupée ou pendante. Les échantillons doivent être prélevés au cours de l'autopsie pour les examens histopathologique ou immunohistochimique, ainsi que pour l'épreuve de PCR.

La pleurésie peut être manifeste en surface de la tumeur, et des abcès sont souvent présents dans le tissu adénomateux.

Dans l'OPA atypique, les tumeurs se composent de nodules blancs, durs, solitaires ou agrégés, présentant une surface sèche à la coupe et sont clairement délimitées du tissu qui les entoure. La présence de liquide en quantité n'est pas un caractère prédominant.

Les moutons adultes, dont l'examen post-mortem révèle qu'ils sont morts d'une pasteurellose aiguë, devraient faire l'objet d'un examen très attentif des poumons : en effet, les lésions de l'OPA peuvent être masquées par la coexistence d'une broncho-pneumonie, d'une pneumonie vermineuse, d'une pneumonie progressive chronique (maedi-visna) ou d'une combinaison de ces maladies. Il est recommandé que des échantillons soient prélevés à l'autopsie pour examen histopathologique.

f) Histopathologie

Histologiquement, les lésions sont caractérisées par la prolifération, principalement, de pneumocytes de type II, une cellule épithéliale sécrétoire dans les alvéoles pulmonaires. Des cellules non ciliées (cellules de Clara) et des cellules épithéliales des bronchioles terminales peuvent être impliquées. Les cellules tumorales cuboïdales ou cylindriques remplacent les fines cellules alvéolaires et forment parfois des proliférations papilliformes qui se projettent dans les alvéoles. Une prolifération intrabronchiolaire peut être observée. Dans les cas avancés, une fibrose extensive peut se développer et, occasionnellement, on peut remarquer la présence de nodules de tissu conjonctif mou au milieu d'une substance de nature mucopolysaccharidique.

Un aspect prédominant de cette pathologie est l'accumulation d'un grand nombre de macrophages alvéolaires dans les alvéoles adjacentes aux lésions néoplasiques (21).

En cas d'affection simultanée à maedi-visna, on pourra observer principalement des infiltrats lymphoïdes périvasculaires, péribronchiolaires et intersticiels.

L'aspect histologique de l'OPA atypique est essentiellement le même que pour l'OPA classique, mais avec une réponse inflammatoire exagérée (surtout à lymphocytes et plasmocytes) et de la fibrose (4).

Pour des explications plus détaillées concernant les aspects cliniques, les observations post-mortem et l'histopathologie de l'OPA, le lecteur pourra se référer à d'autres articles (4, 19).

Il semble qu'il y ait une interaction créant un effet de synergie entre l'OPA et le maedi-visna. La transmission latérale du maedi-visna paraît bien être augmentée chez les moutons atteints de l'OPA (3, 8).

2. Épreuves sérologiques

Actuellement, il n'existe pas d'épreuves de laboratoire qui permettent de pratiquer un diagnostic clinique sur l'animal vivant. Le virus JSRV est exclusivement associé avec les deux formes d'OPA, typique et atypique, mais on ne peut pas détecter des anticorps dirigés contre ce virus dans le sérum des moutons infectés, même en utilisant des épreuves très sensibles comme l'immuno-empreinte (immunoblotting) ou une épreuve immuno-enzymatique (12, 20).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Actuellement, aucun vaccin ni réactif biologique de diagnostic n'est disponible.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BAI J., ZHU R.-Y., STEDMAN K., COUSENS C., CARLSON J.O., SHARP J.M. & DEMARTINI J.C. (1996). Unique long terminal repeat U3 sequences distinguish exogenous jaagsiekte sheep retroviruses associated with ovine pulmonary carcinoma from endogenous loci in the sheep genome. *J. Virol.*, **70**, 3159–3168.
2. CAPORALE M., CENTORAME P., GIOVANNINI A., SACCHINI F., DI VENTURA M., DE LAS HERAS M. & PALMARINI M. (2005). Infection of lung epithelial cells and induction of pulmonary adenocarcinoma is not the most common outcome of naturally occurring JSRV infection during the commercial lifespan of sheep. *Virology*, **338**, 144–153.
3. DAWSON M., VENABLES C. & JENKINS C.E. (1985). Experimental infection of a natural case of sheep pulmonary adenomatosis with maedi-visna virus. *Vet. Rec.* **116**, 588–589.
4. DE LAS HERAS M., GONZALEZ L.G. & SHARP J.M. (2003). Pathology of ovine pulmonary adenocarcinoma. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **275**, 25–54.
5. DE LAS HERAS M., ORTÍN A., SALVATORI D., PÉREZ DE VILLAREAL M., COUSENS C., FERRER L.M., GARCÍA DE JALÓN J.A., GONZALEZ L. & SHARP J.M. (2005). A PCR technique for the detection of Jaagsiekte retrovirus in the blood suitable for the screening of virus infection in sheep flocks. *Res. Vet. Sci.*, **79**, 259–264.
6. DEMARTINI J.C., BISHOP J.V., ALLEN T.E., JASSIM F.A., SHARP J.M., DE LAS HERAS M., VOELKER D.R. & CARLSON J.O. (2001). Jaagsiekte sheep retrovirus proviral clone JSRVJS7, derived from the JS7 lung tumor cell line, induces ovine pulmonary carcinoma and is integrated into the surfactant protein A gene. *J. Virol.*, **75**, 4239–4246.
7. GONZALEZ L., GARCIA-GOTI M., COUSENS C., DEWAR P., CORTABARRIA N., EXTRAMIANA B., ORTIN A., DE LAS HERAS M. & SHARP J.M. (2001). Jaagsiekte sheep retrovirus can be detected in the peripheral blood during the preclinical period of sheep pulmonary adenomatosis. *J. Gen. Virol.*, **82**, 1355–1358.

8. GONZALEZ L., JUSTE R.A., CUERVO L.A., IDIGORAS I. & SAEZ DE OCARIZ C. (1993). Pathological and epidemiological aspects of the coexistence of maedi-visna and sheep pulmonary adenomatosis. *Res. Vet. Sci.*, **54**, 140–146.
9. HECHT S.J., CARLSON J.O. & DE MARTINI J.C. (1994). Analysis of a type D retroviral capsid gene expressed in ovine pulmonary carcinoma and present in both affected and unaffected sheep genomes. *Virology*, **202**, 480–484.
10. HOLLAND M.J., PALMARINI M., GARCIA-GOTI M., GONZALEZ L., DE LAS HERAS M. & SHARP J.M. (1999). Jaagsiekte retrovirus establishes a pantropic infection of lymphoid cells of sheep with naturally and experimentally acquired pulmonary adenomatosis. *J. Virol.*, **73**, 4004–4008.
11. JASSIM F.A. (1988). Identification and characterisation of transformed cells in jaagsiekte, a contagious lung tumour of sheep. PhD thesis. University of Edinburgh, UK.
12. ORTIN A., MINGUIJON E., DEWAR P., GARCIA M., FERRER L.M., PALMARINI M., GONZALEZ L., SHARP J.M. & DE LAS HERAS M. (1997). Lack of a specific immune response against a recombinant capsid protein of Jaagsiekte sheep retrovirus in sheep and goats naturally affected by enzootic nasal tumour or sheep pulmonary adenomatosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **61**, 239–237.
13. PALMARINI M., COUSENS C., DALZIEL R.G., BAI J., STEDMAN K., DEMARTINI J.C. & SHARP J.M. (1996). The exogenous form of Jaagsiekte retrovirus (JSRV) is specifically associated with a contagious lung cancer of sheep. *J. Virol.*, **70**, 1618–1623.
14. PALMARINI M., MURA M. & SPENCER T. (2004). Endogenous betaretroviruses of sheep: teaching new lessons in retroviral interference and adaptation. *J. Gen. Virol.*, **85**, 1–13.
15. PALMARINI M., SHARP J.M., DE LAS HERAS M. & FAN H.Y. (1999). Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep. *J. Virol.*, **73**, 6964–6972.
16. SALVATORI D. (2005). Studies on the pathogenesis and epidemiology of ovine pulmonary adenomatosis (OPA). PhD thesis, University of Edinburgh, Scotland, UK.
17. SALVATORI D., COUSENS C., DEWAR P., ORTIN A., GONZALEZ L., DE LAS HERAS M., DALZIEL R.G. & SHARP J.M. (2004). Effect of age at inoculation on the development of ovine pulmonary adenocarcinoma. *J. Gen. Virol.*, **85**, 3319–3324.
18. SHARP J.M., HERRING A.J., ANGUS K.W., SCOTT F.M.M. & JASSIM F.A. (1985). Isolation and *in vitro* propagation of a retrovirus from sheep pulmonary adenomatosis. In: *Slow Virus Diseases in Sheep, Goats and Cattle*. Sharp J.M. & Hoff-Jorgensen R., eds. CEC Report EUR 8076 EN, Luxembourg, 345–348.
19. SHARP J.M. & DEMARTINI J.C. (2003). Natural history of JSRV in sheep. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **275**, 55–79.
20. SUMMERS C., NEILL W., DEWAR P., GONZALEZ L., VAN DER MOLEN R., NORVAL M. & SHARP J.M. (2002). Systemic immune responses following infection with jaagsiekte sheep retrovirus and in the terminal stages of ovine pulmonary adenocarcinoma. *J. Gen. Virol.*, **83**, 1753–1757.
21. SUMMERS C., NORVAL M., DE LAS HERAS M., GONZALEZ L., SHARP J.M. & WOODS G.M. (2005). An influx of macrophages is the predominant local immune response in ovine pulmonary adenocarcinoma. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **106**, 285–294.
22. VOIGT K., BRÜGMANN M., HUBER K., DEWAR P., COUSENS C., HALL M., SHARP J.M. & GANTER M. (2007). PCR examination of bronchoalveolar lavage samples is a useful tool in preclinical diagnosis of ovine pulmonary adenocarcinoma (Jaagsiekte). *Res. Vet. Sci.*, in press.
23. YORK D.F., VIGNE R., VERWOERD D.W. & QUERAT G. (1992). Nucleotide sequence of the jaagsiekte retrovirus, an exogenous and endogenous type D and B retrovirus of sheep and goats. *J. Virol.*, **66**, 4930–4939.

*
* *

PESTE DES PETITS RUMINANTS

RÉSUMÉ

La peste des petits ruminants (PPR) est une maladie contagieuse aiguë, due à un Morbillivirus de la famille des Paramyxoviridae. Elle affecte principalement les moutons et les chèvres et occasionnellement les petits ruminants sauvages. La PPR est présente en Afrique (entre l'équateur et le Sahara), dans la péninsule arabique, dans la plupart des pays du Proche et du Moyen-Orient, ainsi qu'en Asie du Sud-Ouest.

La maladie clinique ressemble à la peste bovine. Elle est généralement aiguë et se manifeste par du larmolement et un jetage séreux. La PPR est caractérisée par une hyperthermie sévère, des érosions au niveau de plusieurs muqueuses en particulier la muqueuse buccale, de la diarrhée et une pneumonie. À l'autopsie, le gros intestin peut porter des zébrures caractéristiques, mais elles ne sont pas systématiquement retrouvées. Des lésions touchent les poumons montrant une congestion ou une bronchopneumonie lorsqu'elle est associée à une infection bactérienne.

La PPR doit être impérativement différenciée de la peste bovine, de la fièvre catarrhale du mouton, de la fièvre aphteuse et d'autres affections vésiculeuses.

Identification de l'agent pathogène : *un diagnostic par isolement du virus ne peut être réalisé qu'à l'aide de prélèvements effectués au moment le plus approprié. Les prélèvements doivent être effectués pendant la phase aiguë de la maladie, lorsque les signes cliniques sont encore apparents. Ils sont réalisés à partir du larmolement des sécrétions nasales, des muqueuses buccale et rectale, et du sang non coagulé.*

Un diagnostic rapide est effectué à l'aide d'une méthode immuno-enzymatique (ELISA) d'immuno-capture, par électro-synérèse (ou contre-immunoélectrophorèse), ou par immunodiffusion en gélose. Une amplification en chaîne par polymérase (PCR) peut également être utilisée.

Épreuves sérologiques : *les épreuves sérologiques utilisées en routine comprennent un test de séroneutralisation virale et un test ELISA de compétition.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *la vaccination a été dans le passé réalisée avec un vaccin contre la peste bovine obtenu en culture tissulaire en raison de l'existence d'une parenté antigénique forte entre le virus de la peste bovine et celui de la PPR. L'utilisation de ce vaccin hétérologue a été abandonnée pour celle du vaccin homologue atténué vivant qui est, à l'heure actuelle, est largement distribué dans le commerce.*

A. INTRODUCTION

La peste des petits ruminants (PPR) est une maladie virale aiguë des petits ruminants, qui se manifeste par une hyperthermie, des sécrétions oculaires et nasales, une stomatite, une diarrhée, une pneumonie et une haleine nauséabonde repoussante. Les animaux infectés présentent des signes cliniques similaires à ceux de la peste bovine chez les bovins, il faudra donc différencier les deux maladies. Du fait des signes respiratoires, la PPR peut être confondue avec la pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC) ou la pasteurellose. Très souvent, la pasteurellose est une complication secondaire de la PPR, du fait de l'effet immunodépresseur dû au virus de la PPR (PPRV). Le PPRV est transmissible essentiellement par voie aérienne entre animaux en contact étroit (20).

Du fait des similitudes qu'il présente avec ceux de la peste bovine, de la maladie de Carré et de la rougeole, le PPRV a été classé dans le genre *Morbillivirus*, famille des *Paramyxoviridae* (16). Les virus membres de ce groupe ont 6 protéines de structure : la protéine de capsid nucléaire (Np), qui constitue une capsule entourant le génome ARN du virus, la phosphoprotéine (P), qui s'associe avec la polymérase (ou protéine L pour « large » : grande protéine), la protéine de matrice (M), la protéine de fusion (F) et l'hémagglutinine (H). La protéine de matrice, intimement associée avec la face interne de l'enveloppe virale, effectue un lien entre la capsid nucléaire et les glycoprotéines externes virales : H et F, qui sont responsables respectivement de l'attachement et de la pénétration du virus dans la cellule cible. La PPR a été décrite pour la première fois en Côte d'Ivoire (14), mais elle est présente dans la plupart des pays africains entre le sud du Sahara et le nord de l'équateur (20), et dans presque tous les pays du Moyen-Orient jusqu'à la Turquie (13, 21, 26, 27, 37). La PPR est également répandue en Inde et en Asie centrale (34).

La maladie naturelle affecte principalement les chèvres et les moutons. Elle est généralement plus grave chez les chèvres et occasionne de lourdes pertes. Les cas graves chez les moutons ne sont qu'occasionnels. Il est généralement admis que les bovins ne sont atteints que par des formes bénignes. Cependant, dans de mauvaises conditions, il est possible que les bovins développent des lésions après une infection par le PPRV dont les signes cliniques seront attribués à la peste bovine. Ainsi dans les années 1950, la maladie avec mortalité a été décrite chez des bovins expérimentalement infectés par des cultures cellulaires de PPRV (25). De plus, le PPRV a été isolé lors d'une épizootie d'une maladie ressemblant à la peste bovine chez des buffles en Inde en 1995 (17). L'implication du PPRV a également été suspectée dans l'épizootie qui a affecté des dromadaires en Éthiopie en 1995-1996 (28, 29). En effet, l'antigène et l'acide nucléique du PPRV furent détectés dans quelques échantillons pathologiques prélevés lors de cette épizootie, mais aucun virus vivant n'a été isolé. On a rapporté des cas de maladie clinique chez des animaux sauvages, ayant causé la mort de gazelles en captivité (11, 13). Le daim à queue blanche (*Odocoileus virginianus*) peut être infecté expérimentalement (18).

L'incubation dure de 4 à 6 jours, mais peut s'étendre de 3 à 10 jours. La maladie clinique est aiguë, associée à une hyperthermie pouvant atteindre 41 °C et persister 3 à 5 jours. L'animal est abattu, il perd l'appétit, et a le museau sec. Les sécrétions oculaires et nasales deviennent progressivement mucopurulentes, et si la mort n'intervient pas entre temps, elles persistent pendant environ 14 jours. Au cours des 4 premiers jours de l'hyperthermie, une congestion apparaît au niveau des gencives, et la cavité buccale présente des érosions associées à une hypersalivation. Ces lésions peuvent évoluer vers la nécrose. Au stade terminal, une diarrhée profuse non-hémorragique apparaît couramment, ainsi que d'autres signes cliniques : pneumonie, toux, râle pleural, respiration abdominale. Le taux de morbidité peut atteindre 100 % tout comme le taux de mortalité lorsque l'épizootie est particulièrement sévère. Cependant, lorsqu'elle est moins grave, le taux de mortalité ne dépasse guère 50 %. On peut tenter un diagnostic clinique de la PPR à partir de ces signes cliniques, mais en cas de présence de la peste bovine chez les bovins, une confirmation en laboratoire est nécessaire pour différencier la PPR d'autres maladies aux signes cliniques semblables.

À l'autopsie, les lésions sont très proches de celles caractérisant les bovins atteints de peste bovine, à l'exception de croûtes proéminentes sur les lèvres et une pneumonie interstitielle fréquemment observées dans les cas de PPR. Les érosions peuvent s'étendre à partir de la bouche jusqu'à la jonction entre le réseau et le rumen. Le gros intestin porte des stries hémorragiques caractéristiques ou des zébrures, le plus souvent au niveau de la jonction caeco-colique, mais un diagnostic définitif n'est pas toujours possible ; toutefois une entérite nécrotique ou hémorragique est habituellement présente. Les noeuds lymphatiques sont hypertrophiés, la rate peut présenter une nécrose et on constate une pneumonie apicale.

La manipulation du PPRV ne comporte aucun danger pour l'homme, aucun cas d'infection n'a été signalé.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

a) Prélèvements

Chez les animaux vivants, des écouvillonnages sont prélevés au niveau des muqueuses nasale et buccale. Au cours de la phase très précoce de la maladie, on prélève du sang complet sur anti-coagulant pour pouvoir isoler le virus et effectuer une PCR et une analyse hématologique. À l'autopsie (2 à 3 animaux), les noeuds lymphatiques, et notamment les noeuds mésentériques et bronchiques, les poumons, la rate et la muqueuse intestinale doivent être prélevés aseptiquement, refroidis sur de la glace et transportés sous froid. Des fragments d'organes sont collectés pour l'histopathologie et placés dans du formol à 10 %. À la fin de l'épizootie, le sang peut être collecté pour le diagnostic sérologique.

b) Immunodiffusion en gélose

L'immunodiffusion en gélose (IDG) est une épreuve simple et peu coûteuse que l'on peut effectuer dans n'importe quel laboratoire voire directement sur le terrain. On obtient des antigènes viraux PPR normalisés à partir des noeuds lymphatiques bronchiques et mésentériques, de la rate ou des poumons, puis on les met en suspension au 1/3 dans une solution tamponnée. Ces suspensions sont centrifugées à 500 *g* pendant 10 à 20 min, le surnageant est ensuite conservé sous forme d'aliqots à -20 °C. L'extrémité en coton issu du coton-tige utilisé lors de l'écouvillonnage nasal ou oculaire est enlevé à l'aide d'un scalpel et inséré dans une seringue de 1 ml. Avec 0,2 ml de tampon phosphate (PBS, *Phosphate Buffered Saline*), l'échantillon est extrait par des expulsions et des remplissages répétés de 0,2 ml de PBS dans un tube Eppendorf en utilisant le piston de la seringue. L'échantillon extrait de l'écouvillonnage nasal ou oculaire, peut être conservé à -20 °C jusqu'à utilisation, comme la suspension de matériel tissulaire préparé ci-dessus. Il peuvent être conservés jusqu'à 3 ans. On prépare de la même façon un antigène témoin (témoin négatif) à partir de tissus sains. On obtient de l'antisérum normalisé en hyperimmunisant des moutons avec 1 ml de PPRV titré à 10⁴ DICT₅₀ (dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) par ml administrés chaque semaine pendant 4 semaines. Les animaux sont saignés 5 ou 7 jours après la dernière injection (9). La détection des antigènes PPR peut aussi s'effectuer à l'aide d'un antisérum hyperimmun normalisé de lapin anti-peste bovine.

- i) Dans des boîtes de Petri, déposer 1 % de gélose en milieu isotonique contenant un agent bactériostatique comme de l'azide de sodium (1,25 g/litre) ou du thiomersal (0,4 g/litre) (6 ml/5 cm) ;
- ii) Creuser les puits dans la gélose, selon un schéma hexagonal comportant un puits central. Les puits ont 5 mm de diamètre et sont distants de 5 mm ;
- iii) Remplir le puit central avec de l'antisérum positif, puis 3 puits périphériques avec de l'antigène positif et un autre avec de l'antigène négatif. Saturer enfin les 2 autres puits périphériques avec l'antigène à tester de telle sorte que l'antigène à tester et le témoin négatif alternent avec les témoins positifs ;
- iv) De façon générale, 1 à 3 lignes de précipitation vont se former entre le sérum et les antigènes dans un délai de 18 à 24 h (10). On les fait mieux ressortir en lavant la gélose à l'aide d'acide acétique glacial à 5 % pendant 5 min (on procédera à ce lavage sur toutes les épreuves apparemment négatives avant de pouvoir les considérer comme telles). Les réactions positives présentent des lignes d'identité avec l'antigène utilisé comme témoin positif.

On obtient des résultats en 24 h, mais l'épreuve n'est pas assez sensible pour détecter les formes bénignes de PPR du fait de la quantité insuffisante d'antigène viral excrété.

c) Contre-immunoélectrophorèse

L'électro-synérèse (ou contre-immunoélectrophorèse) (CIEP) est l'épreuve la plus rapide pour rechercher un antigène viral (24). Une surface horizontale sert de support à l'épreuve, associée à une cuve d'électrophorèse appropriée comportant 2 compartiments reliés par un pont. L'appareil est branché sur un courant haute-tension. On dépose sur des lames porte-objet des volumes de 3 ml de gélose ou d'agarose (1 à 2 %, [m/v]) dissout dans un tampon d'acétate de barbitone 0,025 M. On creuse dans la gélose solide 6 à 9 paires de trous. On utilise les mêmes réactifs que pour l'IDG. On remplit la cuve d'électrophorèse avec du tampon d'acétate de barbitone 0,1 M. Les puits de gélose sont remplis avec les réactifs : les puits de l'anode avec des sérums et les puits de la cathode avec de l'antigène. La lame est placée sur le pont de liaison, on relie ses extrémités au tampon à l'aide de papier poreux humidifié. On recouvre l'appareil, et on applique à chaque lame un courant de 10 à 12 mA pendant 30 à 60 min, après lesquelles on coupe le courant et on observe les lames sous un éclairage intense. La réaction est positive quand apparaissent 1 à 3 lignes de précipitation entre les paires de puits. Aucune réaction entre les puits témoins négatifs ne doit être observée.

d) Méthode immuno-enzymatique par immunocapture

La méthode immuno-enzymatique (ELISA) par immunocapture (22) utilise 3 anticorps monoclonaux (AcMs) anti-protéine Np, et permet une identification différentielle rapide de la peste bovine et de la PPR. Cette différenciation est essentielle : les deux maladies avaient jusqu'à récemment la même répartition géographique et pouvaient affecter les mêmes espèces animales.

- i) Les plaques de microtitrage (ex : les plaques de haute capacité d'adsorption Maxisorb Nunc) sont sensibilisées avec 100 µl de la solution d'AcMs pièges (diluée selon les instructions du Laboratoire de référence procurant le kit). Ces AcMs réagissent avec les deux virus, peste bovine et PPR ;
- ii) Après un lavage, 50 µl de suspension de prélèvement sont ajoutés dans 4 puits, les puits témoins contenant du tampon ;

- iii) Immédiatement après, on ajoute dans deux des puits, 25 µl d'AcMs de détection du virus de la PPR biotinylié et 25 µl de peroxydase/streptavidine, ainsi que 25 µl d'AcMs de détection du virus de la peste bovine et 25 µl de peroxydase/streptavidine dans les 2 autres ;
- iv) Les plaques sont incubées à 37 °C pendant 1 h, sous agitation continue ;
- v) Après 3 lavages complets, 100 µl d'ortho-phénylènediamine (OPD) dans de l'eau oxygénée sont ajoutés, puis les microplaques sont incubées pour 10 min de plus à température ambiante ;
- vi) On arrête la réaction en ajoutant 100 µl d'acide sulfurique 1 N. L'absorption est mesurée à 492 nm sur un lecteur spectrophotométrique de plaques ELISA.

La limite au delà de laquelle les échantillons sont considérés comme positifs est calculée à partir de chaque blanc (blanc de PPR et blanc de peste bovine) comme étant 3 fois la moyenne des valeurs d'absorbance.

On peut également effectuer un test ELISA sandwich : le prélèvement est d'abord amené à réagir avec l'AcM révélateur, le complexe immun est alors piégé par le second AcM adsorbé sur la plaque ELISA.

Cette épreuve est très spécifique et très sensible (elle peut détecter $10^{0.6}$ DICT₅₀/puits pour le PPRV, et $10^{2.2}$ DICT₅₀ pour celui de la peste bovine). Les résultats sont obtenus en 2 h.

Un autre test immuno-enzymatique de capture a été décrit qui utilise un seul AcM anti-protéine H (31).

e) Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques

Des clones d'ADNc marqués au ³²P ont été utilisés pour différencier la PPR et la peste bovine (6) mais leur utilisation systématique pour le diagnostic est déconseillée : la période du ³²P est réduite et un équipement de protection est nécessaire pour l'utilisateur.

Une réaction de transcription inverse couplée à une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) basée sur l'amplification des gènes des protéines Np et F a été développée pour le diagnostic spécifique de la PPR (5, 12, 33). Cette technique est très sensible par comparaison à d'autres épreuves et elle donne des résultats en 5 h, extraction de l'ARN comprise. Le Laboratoire de référence de l'OIE et de la FAO¹ pour la PPR en France (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*) peut fournir de plus amples informations quant à l'utilisation de cette technique. Une RT-PCR multiplex, basée sur l'amplification de fragments des gènes des protéines Np et M a été développée (15). Un autre type de RT-PCR basé sur le gène de la protéine Np a aussi été décrit (19). Au lieu d'analyser le produit d'amplification – l'amplicon – par électrophorèse en gel d'agarose, celui-ci est détecté par ELISA à l'aide d'une sonde marquée. Ce nouveau système de RT-PCR-ELISA est 10 fois plus sensible que la RT-PCR classique.

f) Méthodes d'isolement et de culture

En vue d'un examen plus approfondi, le virus doit toujours être isolé à partir de prélèvements de terrain en culture tissulaire, et ce même si le diagnostic a déjà été effectué par des techniques rapides (10, 20).

Le PPRV peut être isolé sur cellules de première explantation de rein d'agneau ou sur cellules rénales de singe vervet d'Afrique (Vero). On ensemence des cultures en monocouche avec le matériel suspect (prélèvement d'écouvillonnage, culot leucocytaire ou suspensions tissulaires à 10 %), puis on vérifie quotidiennement si un effet cytopathogène (ECP) apparaît. L'ECP produit par le PPRV peut se développer en 5 jours et se manifeste par l'arrondissement puis par l'aggrégation des cellules qui s'organisent pour former des syncytiums pour les cellules de rein d'agneau. Pour les cellules Vero, il est parfois difficile de voir les syncytiums. S'ils existent, ils sont très petits. Cependant, dans les cellules Vero infectées et marquées, de petits syncytiums sont toujours visibles. Les syncytiums se caractérisent par un arrangement circulaire des noyaux donnant aux cellules une apparence de « cadran d'horloge ». Un ECP apparaîtra avant le cinquième jour pour des cultures sur lamelles porte-objet. Apparaissent également des inclusions intracytoplasmiques et intranucléaires. Certaines cellules ont une vacuole. Des modifications cellulaires peuvent être aussi observées sur les coupes histopathologiques colorées des tissus contaminés. Après 5 ou 6 jours, des passages aveugles doivent être effectués car l'ECP peut ne pas apparaître immédiatement.

1 Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

g) Autres techniques de détection du virus

D'autres techniques de détection du virus présentent des avantages potentiels, mais leur utilisation n'est pas pour l'instant très répandue. Alors que l'isolement du virus nécessite que les échantillons pathologiques soient conservés au froid jusqu'au début de leur traitement, il est possible de les conserver à température ambiante dans une solution formolée de fixation et de les analyser plus tard directement par immunofluorescence (IF) ou par épreuve immunochimique (3, 4, 35). L'IF a été utilisée avec succès sur des frottis de conjonctive et sur des tissus collectés lors de l'autopsie ; les frottis sont fixés en acétone froide. Il a été démontré que contrairement au virus de la peste bovine mais comme les virus de la rougeole, le PPRV a une capacité d'hémagglutination. Cette caractéristique a été utilisée pour le diagnostic spécifique, rapide et peu coûteux de l'infection PPR (17, 39).

2. Épreuves sérologiques

Les chèvres et les moutons infectés par le PPRV produisent des anticorps, ce qui peut confirmer le diagnostic par recherche du virus ou des antigènes. Les tests couramment utilisés sont la séroneutralisation virale (SN), et l'ELISA de compétition.

a) Séroneutralisation virale (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Ce test est sensible et spécifique, mais il demande du temps. La séroneutralisation de référence est réalisée en culture en tubes sous agitation de cellules de première explantation de rein d'agneau, ou de cellules Vero quand les cellules de première explantation ne sont pas disponibles.

- i) Diluer 1 ml de sérum inactivé, 2 fois dans une dilution en séries et mélanger avec une suspension virale stock contenant approximativement 10^3 DICT₅₀/ml ;
- ii) Incuber le mélange virus/sérum soit 1 h à 37 °C, soit toute la nuit à 4 °C ;
- iii) Inoculer 0,2 ml du mélange à chacun des 5 tubes roulants, suivi immédiatement par 1 ml de la suspension de cellules Vero en milieu de culture à un taux de 2×10^5 cellules/ml ;
- iv) Incuber les tubes en pente pendant 3 jours à 37 °C ;
- v) Éliminer les tubes présentant un ECP spécifique du virus ; remplacer le milieu dans les tubes restant avec le milieu de culture, et faire tourner les tubes pendant 7 autres jours. La dose d'épreuve virale est acceptable si elle se situe entre $10^{1,8}$ et $10^{2,8}$ DICT₅₀/ tube. Tout anticorps détectable à une dilution de 1/8, est considéré comme positif.

Habituellement, on effectue un test de séroneutralisation croisée avec le virus de la peste bovine. Un sérum est considéré comme positif vis-à-vis de la PPR lorsque le titre neutralisant est au moins 2 fois plus élevé pour le virus de la PPR que pour celui de la peste bovine.

La SN peut aussi être réalisée en micro-plaques à 96 puits, au lieu d'utiliser des tubes roulants (30).

b) Méthode immuno-enzymatique de compétition

Des ELISA de compétition utilisant d'un AcM anti-nucléoprotéine et une nucléoprotéine recombinante produite en baculovirus ont été décrits (23).

- i) Sensibiliser les plaques de microtitrage (ex : plaques à haute capacité d'adsorption Maxisorb Nunc) avec 50 µl d'une dilution connue de protéines Np-PPR (produites par un baculovirus recombinant), et laisser les 1 h à 37 °C sous agitation continue ;
- ii) Laver les plaques 3 fois et laisser sécher ;
- iii) Placer 45 µl de tampon bloquant (PBS + 0,5 % de Tween 20 + sérum de veau foetal à 0,5 %) dans chaque puits, puis ajouter 5 µl de sérums à analyser dans les puits tests (dilution finale de 1/20^e) et 5 µl de sérums témoins différents (sérum fortement positif, faiblement positif et négatif) dans les puits témoins ;
- iv) Ajouter 50 µl de l'AcM dilué au 1/100^e dans du tampon bloquant, et incuber à 37 °C pendant 1 h ;
- v) Laver les plaques 3 fois et laisser sécher ;
- vi) Ajouter 50 µl de conjugué anti-souris dilué au 1/1 000^e et incuber à 37 °C pendant 1 h ;
- vii) Laver les plaques 3 fois ;

- viii) Préparer de l'OPD dans une solution d'eau oxygénée. Ajouter 50 µl de mélange substrat/conjugué dans chaque puits. Arrêter la réaction au bout de 10 min à l'aide de 50 µl d'acide sulfurique 1 M ;
- ix) Lire les résultats avec un lecteur de plaques ELISA à 492 nm

L'absorption est convertie en pourcentage d'inhibition (PI) selon la formule :

$$PI = 100 - (\text{absorption des puits testés} / \text{absorption des puits témoins AcMs}) \times 100$$

Les sérums dont le PI est supérieur à 50 % sont considérés comme positifs.

Deux autres techniques d'ELISA de compétition, basés sur l'utilisation d'un AcM anti-hémagglutinine (H), ont également été décrites (1, 32).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Les moutons et les chèvres ayant survécu à la PPR, développent, une fois guéris, une immunité active contre la maladie. Étant donné que les anticorps ont été mis en évidence 4 ans après l'infection (9), il est probable que l'immunité dure toute la vie. Un vaccin homologue de la PPR est disponible. En 1998, le Comité International de l'OIE a approuvé l'utilisation de ce vaccin dans les pays ayant décidé de suivre la « procédure de l'OIE » pour la surveillance épidémiologique pour la peste bovine afin d'éviter toute confusion lors des enquêtes sérologiques. Deux rapports ont été publiés sur les résultats préliminaires obtenus avec un vaccin recombinant capripox-PPR pouvant protéger à la fois contre les infections à capripox et la PPR (2, 7). La production du vaccin atténué anti-PPR disponible dans le commerce est décrite ci-dessous.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Le vaccin contre le virus de la PPR et produit à partir de la souche Nigeria 75/1 est un vaccin vivant cultivé sur des cellules Vero. La souche initiale du virus a été isolée au Nigeria en 1975 (36). Elle a été atténuée par plusieurs passages sur cultures cellulaires Vero (8). La souche utilisée pour fabriquer le vaccin correspond au 70^e passage sur cellules Vero (PPRV 75/1 LK6 BK2 Vero 70). Il est stocké sous forme lyophilisée à -20 °C et peut être obtenu auprès des Laboratoires de références (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Des tests d'activité du vaccin montrent qu'il conserve son pouvoir protecteur (à une dose de 10³ DICT₅₀) jusqu'au 120^e passage en cellules Vero, qui reste jusqu'à présent le dernier passage testé.

b) Méthode de culture

- **Cellules**

Le vaccin PPR est produit sur cellules Vero, qui doivent être exemptes de toute contamination bactérienne, fongique ou virale.

- **Milieu de culture**

Le milieu de culture consiste en du milieu essentiel minimum (MEM) auquel on ajoute des antibiotiques (par exemple de la pénicilline et de la streptomycine à des concentrations finales respectives de 100 UI [Unités Internationales]/ml et 100 µg/ml), et un agent antifongique (nystatine [Mycostatine] à une concentration finale de 50 µl/ml). Le milieu est enrichi avec 10 % de sérum de veau foetal (milieu complet) pour la croissance des cellules. Cette proportion est réduite à 2 % pour un milieu d'entretien une fois que le tapis cellulaire est complet.

- **Lot de semences primaires du virus vaccin**

Ceci concerne le virus lors de son 70^e passage en cellules Vero (PPRV 75/1 LK6 BK2 Vero 70). Le contenu lyophilisé d'un flacon de la banque de semences est reconstitué avec 2 ml d'eau stérile (ou de milieu de culture cellulaire sans sérum). Ce liquide est mélangé aux cellules Vero en suspension dans un milieu de culture complet afin d'assurer au moins 0,001 DICT₅₀ par cellule. On remplit les flacons de culture cellulaire avec ce mélange virus/cellule (environ 2x10⁷ cellules Vero dans un récipient de 175 cm³), et on les place en incubation à 37 °C. On examine régulièrement les cellules cultivées à la recherche d'un éventuel ECP. Le milieu est renouvelé tous les 2 jours, en réduisant la proportion de sérum à 2 % une fois que le tapis cellulaire est constitué. La première récolte de virus a lieu lorsque l'ECP atteint 40 ou 50 %. Cette suspension virale est conservée à -70 °C. Les récoltes suivantes s'effectuent tous les 2 jours jusqu'à ce que l'ECP atteigne 70 ou 80 %. Il convient alors de congeler les flacons de culture (généralement 2 récoltes

supplémentaires sont encore possibles avant la congélation finale des supports de culture). Toutes les suspensions de virus ainsi récoltées font l'objet de 2 cycles de congélation/décongélation, puis elles sont réunies pour former un lot unique, qui servira de lot de semence primaire. Ce lot est divisé en aliquots placés dans des flacons conservés à -70°C . Les contenus de cinq de ces flacons sont décongelés et titrés (titre minimum exigé : 10^5 DICT₅₀/ml). Mieux vaut lyophiliser la semence afin de la conserver à -20°C . Dans ce cas, il sera nécessaire de titrer le virus lyophilisé (5 flacons). Un lot obtenu de cette manière, doit satisfaire tous les tests de stérilité.

Lors de la préparation des lots de semence, il est important de ne pas ensemençer les cellules avec une très grande quantité de virus (haut degré de multiplicité de l'infection), ceci favoriserait l'accumulation de particules défectives dans la suspension virale produite, et abaisserait ainsi le titre des produits ultérieurs. D'autre part, une très faible multiplicité de l'infection (par exemple 0,0001) prolongera le temps de culture.

- **Préparation du lot de semence de travail**

Cette préparation s'effectue dans les mêmes conditions que celle du lot de semence primaire. Une grande quantité de virus est produite, à partir de laquelle sera fabriqué le vaccin final. Ce lot est réparti dans des récipients et conservé à -70°C . Il doit satisfaire tous les tests de stérilité. On titre 5 prélèvements (titre minimum exigé : 10^6 DICT₅₀/ml).

c) **Validation de la semence candidate comme semence vaccinale**

Il est nécessaire de confirmer ou d'infirmer, la présence de PPRV dans le produit testé. On utilise dans ce but du sérum anti-virus PPR afin de neutraliser le virus présent dans la culture cellulaire.

- **Protocole**

- Mélanger les contenus de 2 flacons de vaccin à de l'eau bidistillée stérile, de façon à reconstituer le volume existant avant la lyophilisation ;
- Effectuer des dilutions de 10 en 10 du vaccin reconstitué dans un milieu de culture sans sérum (0,5 ml de suspension virale + 4,5 ml de milieu) ;
- Réaliser, sur une microplaque à 96 puits, 2 séries de mélanges avec les dilutions virales de chaque flacon, de la façon suivante :

Série 1:	Dilutions de la suspension virale :	–1	–2	–3	–4
	Suspension virale (en µl)	50	50	50	50
	Milieu de culture (en µl)	50	50	50	50
Série 2:	Dilutions de la suspension virale :	–1	–2	–3	–4
	Suspension virale (en µl)	50	50	50	50
	Antisérum de la PPR (en µl)	50	50	50	50

(Note : l'antisérum de PPR utilisé dans ce cas est préparé sur mouton puis il est lyophilisé. Il est reconstitué avec 1 ml d'eau bidistillée stérile, à une dilution de 1/10).

- Incuber les mélanges à 37°C pendant 1 h ;
- Ajouter dans chaque puits 100 µl de suspension cellulaire en milieu de culture complet (30 000 cellules/puits) ;
- Incuber la microplaque à 37°C , en présence de CO_2 ;
- Procéder à la lecture de la microplaque après 10 à 15 h d'incubation.

Normalement, l'ECP n'est observé que dans les puits contenant des cellules infectées par le mélange viral et le milieu de culture. S'il apparaît dans les puits de la série 2, il faut procéder à l'identification du PPRV par immunofluorescence, à l'aide d'un AcM de la PPR, ou par immunocapture (l'AcM spécifique de la PPR et le kit de diagnostic sont disponibles auprès du Laboratoire de référence de l'OIE pour la PPR en France, se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Si cette identification confirme la présence d'un PPRV, cela signifie que l'antisérum PPR utilisé devait être trop faible ou que le lot devra être changé. Si l'épreuve d'immunofluorescence ou d'immunocapture est négatif, la présence d'un contaminant viral ne fait plus aucun doute, les substances analysées doivent donc être détruites.

2. Méthode de production

a) Production du vaccin

Cette opération s'effectue à plus grande échelle. Les cellules peuvent être infectées avec un virus à multiplicité d'infection comme celle vue précédemment ou avec des doses plus élevées, par exemple jusqu'à 0,01. Après 2 cycles de congélation-décongélation, les produits des différentes récoltes sont rassemblés (afin de former un produit final) et conservés à -70°C en attendant les résultats du titrage et des tests de stérilité. Le vaccin est lyophilisé si ces résultats sont satisfaisants.

b) Lyophilisation

Le milieu de lyophilisation (milieu Weybridge) est composé de 2,5 % (m/v) de lactalbumine, 5 % (m/v) de saccharose, et 1 % (m/v) de glutamate de sodium, pH 7,2.

Pour la lyophilisation, on mélange un volume de ce mélange à un volume égal de suspension virale (qui doit avoir été préalablement diluée pour pouvoir disposer du nombre nécessaire de doses de vaccin par flacon). Le mélange ainsi obtenu est réfrigéré, homogénéisé, réparti dans des flacons et lyophilisé. À la fin d'un cycle de lyophilisation, on règle la sonde à 35°C pour 4 h. Une fois l'opération terminée, les flacons sont scellés sous vide. Des échantillons prélevés au hasard (par ex. 5 %) dans le lot final sont soumis à des tests d'innocuité, d'efficacité, et de stérilité. L'humidité résiduelle est estimée par la méthode de Karl Fisher (optimum $\leq 3,5\%$). Si les résultats des tests ne s'avèrent pas satisfaisants, le lot entier doit être détruit.

3. Contrôles en cours de fabrication

On doit s'assurer que les cellules utilisées pour les cultures ont une apparence normale et qu'elles ne sont contaminées par aucun virus, notamment le virus de la diarrhée virale bovine. Un titrage du virus doit être effectué sur le lot de semence : à l'aide d'un milieu MEM (sans sérum), on effectue une série de dilutions décimales (0,5 ml de virus + 4,5 ml de diluant) de façon à ce que leur concentration en produit à titrer atteigne 10^{-6} . Les cellules Vero d'un flacon sont trypsinisées et mises en suspension en milieu de culture complet (300 000/ml). Elles sont ensuite placées sur une microplaque à 96 trous (30 000 cellules par puits, soit 100 μl de suspension cellulaire). Puis, 100 μl de virus en dilution décimale sont ajoutés aux cellules (dilutions comprises entre 10^{-2} et 10^{-6}). Une rangée de puits joue le rôle de témoin pour les cellules infectées auxquelles on ajoute du milieu de culture sans virus (100 μl). La microplaque est incubée à 37°C en présence de CO_2 . La lecture de la plaque (recherche d'ECP) s'effectue 10 à 15 jours après l'infection.

Le titre du virus est déterminé par la méthode Spearman-Kärber. Le titre minimum par dose est de $10^{2,5}\text{DICT}_{50}/\text{ml}$.

4. Contrôles des lots

a) Identité

L'identité du contenu d'un des récipient de chaque lot de répartition doit être vérifiée par culture après neutralisation par un antisérum spécifique.

b) Stérilité

Il s'agit de rechercher une éventuelle contamination par un virus, une bactérie ou un champignon. On teste les cellules et les sérums avant qu'ils soient utilisés pour la production du vaccin et la réserve de semence et le vaccin avant et après le processus de lyophilisation. Tout produit ne satisfaisant pas ce test sera détruit.

Les tests de stérilité et de non-contamination par du matériel biologique sont décrits dans le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

c) Innocuité

On effectue ce test sur des rongeurs afin de rechercher toute toxicité non-spécifique associée au produit. Ce test nécessite un vaccin reconstitué dans du solvant (contenus de 5 flacons mélangés), 6 cobayes pesant entre 200 et 250 g, 10 souris non-sevrées (17 à 22 g, lignée Swiss ou équivalente).

Le vaccin, 0,5 ml, est injecté par voie intramusculaire dans l'une des pattes postérieures de 2 cobayes, 0,5 ml dans la cavité péritonéale de 2 autres cobayes et enfin 0,1 ml dans la cavité péritonéale de 6 souris. Deux cobayes et 4 souris non-inoculés sont conservés comme témoins. On garde les animaux en observation pendant 3 semaines. Si un cobaye ou 2 souris viennent à mourir, le test doit être renouvelé. On

procède à l'autopsie des animaux morts afin de s'assurer de la cause de cette mort. Au bout des 3 semaines d'observation, on sacrifie les animaux pour les autopsier. On note tous les résultats. Le vaccin est considéré comme satisfaisant si, pour le premier ou le second test, plus de 80 % des animaux restent en bonne santé durant les 3 semaines d'observation, et si aucune lésion n'est décelée à l'autopsie.

d) Activité et efficacité sur les petits ruminants

Ce test nécessite ce qui suit : un vaccin reconstitué en soluté isotonique (contenus de 5 flacons mélangés) de façon à disposer de 100 doses et de 0,1 dose/ml, 6 chèvres et 6 moutons, tous âgés d'environ 1 an et ne possédant pas d'anticorps contre la peste bovine ou la PPR, des seringues et des aiguilles stériles, et du PPRV pathogène préalablement titré sur des chèvres, et dilué en soluté isotonique de façon à disposer de 10^3 doses léthales pour 50 % des chèvres (LD_{50}).

Vacciner 2 chèvres et 2 moutons par voie sous-cutanée à raison de 100 doses par animal. Vacciner 2 chèvres et 2 moutons par voie sous-cutanée avec 0,1 dose par animal. Maintenir les autres animaux en contact avec les animaux vaccinés pour qu'ils jouent le rôle de témoins. Garder les animaux en observation. Prendre leur température quotidiennement pendant 3 semaines. À la fin de cette période, on prélève du sang sur tous les animaux en vue de la préparation des sérums. On injecte 1 ml de suspension de PPRV pathogène ($10^3 LD_{50}$ par animal) par voie sous-cutanée à tous les animaux. Pendant 2 semaines, on les garde en observation et on relève leur température corporelle quotidiennement.

Le vaccin est considéré comme satisfaisant si tous les animaux vaccinés résistent à l'épreuve virulente d'infection, alors qu'au moins la moitié des animaux témoins développent des signes de PPR. L'épreuve de SN doit révéler la présence d'anticorps de la PPR (pour un sérum dilué au moins au $1/10^6$) chez les animaux vaccinés, uniquement dans des prélèvements effectués 3 semaines après la vaccination. Si l'un des témoins est également positif, l'expérience doit être renouvelée avec un autre lot de PPRV pathogène. Le lot de vaccin sera détruit si les animaux réagissent à l'épreuve d'infection.

- **Titration des anticorps neutralisants de la PPR**

Cette épreuve nécessite ce qui suit : des suspensions cellulaires à 600 000/ml, des microplaques de culture cellulaire à 96 trous, des sérums à titrer (inactivés par chauffage à 56 °C pendant 30 min), du milieu de culture cellulaire, du PPRV dilué de manière à contenir 1 000 ; 100 ; 10 et 1 $DICT_{50}$ /ml.

Diluer les sérums à 1/5, puis faire une dilution 2 fois en milieu de culture. Dans les puits d'une plaque de culture cellulaire, mélanger 100 µl de virus à 1 000 $DICT_{50}$ /ml (de façon à contenir 100 $DICT_{50}$ dans chaque puits) à 100 µl de sérum d'une dilution donnée (en utilisant 6 puits par dilution). Disposer une série de puits témoins pour le virus et les cellules infectées de la façon suivante : 6 puits avec 100 $DICT_{50}$ (100 µl) par puits, 6 puits avec 10 $DICT_{50}$ (100 µl) par puits, 6 puits avec 1 $DICT_{50}$ (100 µl) par puits, 6 puits avec 0,1 $DICT_{50}$ (100 µl) par puits, et 6 autres avec 200 µl de culture sans virus (cellules témoins) par puits.

Compléter les puits contenant le virus témoin avec du milieu de culture complet pour atteindre un volume de 100 µl, et incuber les plaques pendant 1 h, à 37 °C. Ajouter 50 µl de suspension cellulaire à chaque puits. Incuber les plaques à 37 °C en présence de CO_2 . Procéder à la lecture des plaques après 1 ou 2 semaines d'incubation. Les résultats devraient être les suivants : 100 % d'ECP pour les puits de témoins viraux de 100 et 10 $DICT_{50}$, 50 % d'ECP pour les dilutions à 1 $DICT_{50}$, absence d'ECP pour les dilutions à 0,1 $DICT_{50}$, absence d'ECP dans les puits où le virus a été neutralisé par le sérum pendant l'épreuve et présence d'ECP dans les puits où le virus ne l'a pas été.

e) Durée de l'immunité

La durée de l'immunité est de 3 ans au moins.

f) Stabilité

Le vaccin lyophilisé peut être conservé au moins 2 ans entre 2 et 8 °C (une température de conservation de -20 °C est cependant plus conseillée), s'il est maintenu sous vide et à l'abri de la lumière. Récemment, il a été démontré que ce vaccin en suspension dans du milieu contenant du tréhalose et soumis à la méthode ultra rapide de déshydratation, peut résister à une température de 45 °C pendant 14 jours avec une perte minimale d'efficacité (38).

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir Partie C.4.c.

b) Activité

Voir Partie C.4.d.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANDERSON J. & MCKAY J.A. (1994). The detection of antibodies against peste des petits ruminants virus in cattle, sheep and goats and the possible implication to rinderpest control programmes. *Epidemiol. Infect.*, **112**, 225–234.
2. BERGE 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.
3. BROWN C.C., MARINER J.C. & OLANDER H.J. (1991). An immunohistochemical study of the pneumonia caused by peste des petits ruminants virus. *Vet. Pathol.*, **28**, 166–170.
4. BUNDZA A., AFSHAR A., DUKES T.W., MYERS D.J., DULAC G.C. & BECKER S.A.W.E. (1988). Experimental peste des petits ruminants (goat plague) in goats and sheep. *Can. J. Vet. Res.*, **52**, 46–52.
5. COUACY-HYMAN R.F., HURARD C., GUILLLOU J.P., LIBEAU G. & DIALLO A. (2002). Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods*, **100**, 17–25.
6. DIALLO A., BARRETT T., BARBRON M., SUBBARAO S.M. & TAYLOR W.P. (1989). Differentiation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses using specific cDNA clones. *J. Virol. Methods*, **23**, 127–136.
7. DIALLO A., MINET C., BERGE G., LE GOFF C., BLACK D.N., FLEMING M., BARRETT T., GRILLET C. & LIBEAU G. (2002). Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Ann. NY Acad. Sci.*, **969**, 88–91.
8. DIALLO A., TAYLOR W.P., LEFEVRE P.C. & PROVOST A. (1989). Atténuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants: candidat pour un vaccin homologue vivant. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **42**, 311–319.
9. DUROJAIYE O.A. (1982). Precipitating antibody in sera of goats naturally affected with peste des petits ruminants. *Trop. Anim. Health Prod.*, **14**, 98–100.
10. DUROJAIYE O.A., OBI T.U. & OJO O. (1983). Virological and serological diagnosis of peste des petits ruminants. *Trop. Vet.*, **1**, 13–17.
11. ELZEIN E.M., HOUSAWI F.M., BASHAREEK Y., GAMEEL A.A., AL-AFALEQ A.I. & ANDERSON E. (2004). Severe PPR infection in gazelles kept under semi-free range conditions. *J. Vet. Med. [B] Infect. Dis. Vet. Public Health*, **51**, 68–71.
12. FORSYTH M.A. & BARRETT T. (1995). Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste de petit ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Res.*, **39**, 151–163.
13. FURLEY C.W., TAYLOR W.P. & OBI T.U. (1987). An outbreak of peste des petits ruminants in a zoological collection. *Vet. Rec.*, **121**, 443–447.
14. GARGADENNEC L. & LALANNE A. (1942). La peste des petits ruminants. *Bull. Serv. Zoo. A.O.F.*, **5**, 15–21.
15. GEORGE A., DHAR P., SREENIVASA B.P., SINGH R.P. & BANDYOPADHYAY S.K. (2006). The M and N genes based simplex and multiplex PCRs are better than the F or H gene based simplex PCR for peste des petits ruminants virus. *Acta. Virol.*, **50**, 217–222.
16. GIBBS E.P.J., TAYLOR W.P., LAWMAN M.J.P. & BRYANT J. (1979). Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus *Morbillivirus*. *Intervirology*, **11**, 268–274.

17. GOVINDARAJAN R., KOTEESWARAN A., VENUGOPALAN A.T., SHYAM G., SHAGU S., SHAILA, M.S. & RAMACHANDRAN S. (1997). Isolation of peste des petits ruminants virus (PPRV) from an outbreak in Indian Buffalo (*Bubalus bubalus*). *Vet. Rec.*, **141**, 573–574.
18. HAMDY F.M. & DARDIRI A.H. (1976). Response of white-tailed deer to infection with peste des petits ruminants virus. *J. Wildl. Dis.*, **12**, 516–522.
19. KUMAR C.S., RAJ G.D., THANGAVELU A. & SHAILA M.S. (2007). Performance of RT-PCR-ELISA for the detection of peste des petits ruminants virus. *Small Rumin. Res.*, **72**, 200–208.
20. LEFEVRE P.C. & DIALLO A. (1990). Peste des petits ruminants. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **9**, 951–965.
21. LEFEVRE P.C., DIALLO A., SCHENKEL F., HUSSEIN S. & STAACK G. (1991). Serological evidence of peste des petits ruminants in Jordan. *Vet. Rec.*, **128**, 110.
22. 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.
23. LIBEAU G., PREHAUD C., LANCELOT R., COLAS F., GUERRE L., BISHOP D.H.L. & DIALLO A. (1995). Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Res. Vet. Sci.*, **58**, 50–55.
24. MAJIYAGBE K.A., NAWATHE D.R. & ABEGUNDE A. (1984). Rapid diagnosis of PPR infection, application of immuno-electro-osmophoresis (IEOP) technique. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **37**, 11–15.
25. MORNET P., ORUE J., GILBERT Y., THIERY G. & SOW M. (1956). La peste des petits ruminants en Afrique Occidentale Française. Ses rapports avec la peste bovine. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **9**, 313–342.
26. OZKUL A., AKCA Y., ALKAN F., BARRETT T., KARAOGLU T., DAGALP S.B., ANDERSON J., YESILBAG K., COKCALISKAN C., GENÇAY A. & BURGU I. (2002). Prevalence, distribution, and host range of Peste des petits ruminants virus in Turkey. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 708–712.
27. PERL S., ALEXANDER A., YAKOBSON B., NYSKA A., HARMELIN A., SHEIKHAT N., SHIMSHONY A., DAVIDSON N., ABRAMSON M. & RAPOPORT E. (1994). Peste des petits ruminants (PPR) of sheep in Israel: case report. *Israel J. Vet. Med.*, **49**, 59–62.
28. ROGER F., GUEBRE YESUS M., LIBEAU G., DIALLO YIGEZU L.M. & YILMA, T. (2001). Detection of antibodies of rinderpest and peste des petits ruminants viruses (Paramyxoviridae, Morbillivirus), during a new epizootic disease in Ethiopian camels (*Camelus dromedarius*). *Rev. Med. Vet.*, **152**, 265–268.
29. ROGER F., YIGEZU L.M., HURARD C., LIBEAU G., MEBRATU G.Y., DIALLO A. & FAYE B. (2000). Investigations on a new pathological condition of camels in Ethiopia. *J. Camel Pract. Res.*, **7**, 163–165.
30. ROSSITER P.B., JESSETT D.M. & TAYLOR W.P. (1985). Microneutralisation systems for use with different strains of peste des petits ruminants virus and rinderpest virus. *Trop. Anim. Health Prod.*, **17**(2), 75–81.
31. SALIKI J.T., HOUSE J.A., MEBUS C.A. & DUBOVI E.J. (1994). Comparison of monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and virus isolation for detection of peste des petits ruminants virus in goat tissues and secretions. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1349–1353.
32. SALIKI J.T., LIBEAU G., HOUSE J.A., MEBUS C.A. & DUBOVI E.J. (1993). Monoclonal antibody-based blocking enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection and titration of peste-des-petits ruminants virus antibody in caprine and ovine sera. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1075–1082.
33. SARAVANAN P., SINGH R.P., BALAMURUGAN V., DHAR P., SREENIVASA B.P., MUTHUCHELVAN D., SEN A., ALEYAS A.G., SINGH R.K. & BANDYOPADHYAY S.K. (2004). Development of an N gene-based PCR-ELISA for detection of Peste-des-petits-ruminants virus in clinical samples. *Acta Virol.*, **48**, 249–255.
34. SHAILA M.S., PURUSHOTHAMAN V., BHASAVAR D., VENUGOPAL K. & VENKATESAN R.A. (1989). Peste des petits ruminants in India. *Vet. Rec.*, **125**, 602.
35. SUMPTION K.J., ARADOM G., LIBEAU G. & WILSMORE A.J. (1998). Detection of peste des petits ruminants antigen in conjunctival smears of goats by indirect immunofluorescence. *Vet. Rec.*, **142**, 421–424.

36. TAYLOR W.P. & ABEGUNDE A. (1975). The isolation of peste des petits ruminants virus from Nigerian sheep and goats. *Res. Vet. Sci.*, **26**, 94–96.
37. TAYLOR W.P., ALBUSAYDI S. & BARRETT T. (1990). The epidemiology of peste des petits ruminants in the Sultanate of Oman. *Vet. Microbiol.*, **22**, 341–352.
38. WORRWALL E.E., LITAMOI J.K., SECK B.M. & AYELET G. (2001). Xerovac: an ultra rapid method for the dehydration and preservation of live attenuated rinderpest and peste des petits ruminants vaccines. *Vaccine*, **19**, 834–839.
39. WOSU L.O. (1991). Haemagglutination test for diagnosis of peste des petits ruminants disease in goats with samples from live animals. *Small Rumin. Res.*, **5**, 169–171.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de références de l'OIE pour la Peste des petits ruminants (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).

CHAPITRE 2.7.12.

SALMONELLOSE
(*S. abortusovis*)

Se reporter au Chapitre 2.9.9. Salmonelloses.

*
* *

TREMBLANTE

RÉSUMÉ

La tremblante est une maladie infectieuse neurodégénérative qui apparaît naturellement chez les moutons et les chèvres. Elle est caractérisée par des modifications vacuolaires ou spongiformes dans le système nerveux central (SNC). Elle a été identifiée comme entité morbide voici plus de deux siècles et demi. Plus tard, elle a été reconnue comme une encéphalopathie spongiforme transmissible (EST) et une maladie à prion. Les EST ou les maladies à prion sont définies comme une accumulation d'une forme anormale d'une glycoprotéine de membrane de l'hôte (la protéine prion ou PrP) ; cette accumulation a lieu dans certains tissus notamment le SNC et les organes lymphoréticulés. Selon l'hypothèse du prion, cette isoforme anormale, dénommée PrP^{Sc}, est un composant de l'agent causal et est peut-être même l'agent causal unique.

Les polymorphismes du gène PrP du mouton qui code la protéine sont associés à l'apparition de la forme classique de tremblante chez plusieurs races de mouton. La reconnaissance des génotypes PrP de mouton a été utilisée dans la lutte contre la tremblante classique, mais aucun génotype ne semble complètement résistant à l'infection. Une nouvelle variante, dénommée « tremblante atypique » a été détectée récemment chez des génotypes PrP de mouton qui étaient apparemment résistants à la forme classique. Certains possèdent un polymorphisme au niveau du codon 141 du gène PrP. La tremblante classique est enzootique dans de nombreuses parties du monde où elle a été introduite par des importations. L'Australie et la Nouvelle Zélande ont conservé le statut de pays indemnes par des mesures de restrictions sévères des importations et d'autres mesures. L'infection chez les ovins peut être transmise de la brebis à l'agneau pendant la période allant de la parturition au sevrage. L'infection peut également passer horizontalement entre moutons et chèvres issus de troupeaux distincts, spécialement lorsque la parturition a lieu dans un espace restreint. On sait que les membranes fœtales sont une source d'infection. La période d'incubation entre l'infection initiale et la maladie clinique dépasse presque toujours 1 an et excède parfois la durée de vie commerciale du mouton. La majorité des cas chez le mouton apparaît entre l'âge de 2 et 5 ans. La maladie clinique se développe seulement si l'agent infectieux pénètre dans le SNC.

Identification de l'agent pathogène : *la maladie est reconnue grâce aux signes cliniques, qui débutent insidieusement par des anomalies comportementales. Celles-ci peuvent passer inaperçues dans un premier temps, mais progressent généralement vers des signes nerveux plus évidents incluant prurit et incoordination. La dégradation de la condition générale est également commune. Le tableau clinique est variable dans la durée et dans la gamme des signes présents, mais il est inévitablement fatal. Le diagnostic clinique est soutenu par l'immunodétection des accumulations de la protéine prion spécifique de la maladie dans le cerveau ou dans les tissus lymphoréticulés, ou par le diagnostic histopathologique d'une encéphalopathie spongiforme ou enfin par la détection par microscopie électronique de fibrilles associées à la tremblante. Les lésions du cerveau sont caractérisées par une vacuolisation neuronale bilatérale et généralement symétrique, et des changements spongiformes de la matière grise, dans le tronc cérébral pour la forme classique mais prédominants dans le cervelet pour la forme atypique. La détection de la PrP^{Sc} dans des extraits ou des coupes de tissus de cerveaux malades est un critère de diagnostic spécifique de la maladie. L'immunohistochimie peut être utilisée pour détecter les accumulations anormales de PrP sur des coupes de cerveau ou de tissus lymphoréticulés préparés en routine pour l'histopathologie. La PrP^{res}, une forme tronquée de la protéine prion partiellement résistante à la protéase, peut être détectée dans du matériel cérébral non fixé par une extraction à l'aide de détergents, une digestion enzymatique, une électrophorèse et une immuno-empreinte (immunoblotting). Une automatisation de la détection par immunochimie de la protéine dans des échantillons de cerveau sert de base aux tests rapides utilisés dans les programmes de dépistage actif.*

La détection de la PrP^{Sc} dans les tissus lymphoréticulés pendant la période d'incubation de la tremblante chez certains animaux offre la ressource d'un diagnostic préclinique d'une infection par la tremblante par procuration et peut être particulièrement utile à des fins de la surveillance quand il est réalisé sur des biopsies de tissus.

Les formes atypiques de tremblante dépistées essentiellement lors d'une surveillance active ne sont que partiellement caractérisées à des fins diagnostiques, et demeurent l'objet de recherches complémentaires.

La plupart des formes de tremblante, mais pas toutes, peuvent être transmises aux rongeurs de laboratoire en leur injectant du tissu cérébral infecté, mais l'efficacité variable de la transmission couplée à une longue durée d'incubation empêchent d'en faire une procédure diagnostique raisonnable.

Épreuves sérologiques : *l'infection par la tremblante n'est pas connue pour susciter une quelconque réponse immunitaire spécifique et il n'existe aucune base pour établir un diagnostic par la détection d'anticorps spécifiques.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *aucun vaccin ni aucun produit biologique ne sont disponibles actuellement.*

A. INTRODUCTION

La tremblante est une maladie infectieuse neurodégénérative, progressive, fatale, qui apparaît naturellement chez le mouton et la chèvre, et qui a été reconnue comme une entité morbide touchant les élevages de moutons dans les pays d'Europe de l'Ouest depuis au moins les deux derniers siècles et demi passés. La description histologique des lésions dans le système nerveux central (SNC) a été faite à la fin du 19^e siècle et la transmission expérimentale a été réalisée dans les années 1930, mais ce n'est qu'à la fin du 20^e siècle que la dénomination « encéphalopathie spongiforme transmissible » (EST) s'est généralisée pour décrire la tremblante et les autres maladies apparentées des humains et des animaux. Depuis la découverte de la protéine prion dans les années 1980, ces maladies sont maintenant connues comme des maladies à prion (voir Chapitre 2.4.6., « Encéphalopathie spongiforme bovine [ESB] »). L'apparition de la tremblante a précédé la reconnaissance des autres maladies à prion des mammifères, et la tremblante est, de ce fait, l'archétype de ces maladies (18). Les maladies à prion sont définies par la présence d'une isoforme anormale d'une protéine membranaire codée par l'hôte (PrP^C), désignée par le sigle PrP^{Sc}, qui s'accumule dans le SNC et le système lymphoréticulé (SLR) et parfois dans d'autres tissus. L'hypothèse du prion propose que la protéine altérée soit le composant principal de l'agent causal voire l'agent causal lui-même. Il est aussi proposé que les différentes souches de l'agent résultent de différentes conformations de la protéine. D'autres hypothèses sur la nature de l'agent telles qu'un lentivirus, un virus non conventionnel ou le virino, qui toutes supposent l'existence d'un génome constitué d'acides nucléiques (qui n'a jamais été identifié) ont été proposées dans le passé (18).

Comme pour d'autres maladies infectieuses, les interactions entre les variables de l'agent pathogène (notamment les souches) et les variables de l'hôte (notamment, dans le cas des EST, la séquence du gène *PrP* et la présence ou l'absence de certains allèles au sein des races) sont bien connues pour déterminer le phénotype de la maladie. Chez le mouton, différents allèles du gène (*PrP* génotypes) sont associés à la sensibilité des animaux aux EST (17). Le gène *PrP* du mouton est très polymorphique. Les polymorphismes les plus courants ont été identifiés au sein de la région du gène *PrP* codant la protéine, au niveau des codons 136, 154 et 171. L'incidence de la tremblante dans diverses races de mouton a été associée à certains de ces polymorphismes. Les polymorphismes du codon 171 ont une importance particulière pour la détermination du risque total.

La détection et la caractérisation de différentes souches de tremblante ont été basées, historiquement, sur la transmission à des rongeurs, en particulier les souris (type sauvage). Quelques 20 voire plus de « souches murines » ont été ainsi dérivées d'isolats naturels de tremblante ; caractérisées phénotypiquement sur souris sur la base de la période d'incubation et le profil des lésions cérébrales dans des zones précises des matières grise et blanche (typage biologique des souches) (6). Bien que la reproductibilité et la stabilité d'un phénotype obtenu par transmission en série sur souris d'un isolat ait fourni la base d'un tel typage, les souches murines de tremblante obtenues ne représentent pas forcément les souches originelles de tremblante (voir Chapitre 2.4.6.) et il n'est pas clairement établi combien de souches différentes pourraient survenir chez le mouton dans les conditions naturelles. Comme certains isolats naturels de tremblante ne se transmettent pas aux souris (type sauvage), la caractérisation par cette méthode est limitée. L'utilisation de souris transgéniques exprimant le gène *PrP* de l'hôte naturel plutôt que le gène *PrP* de la souris ouvre de nouveaux horizons pour le typage biologique, mais les données enregistrées ne sont pas aussi nombreuses que celles obtenues sur le type sauvage. Les méthodes moléculaires de typage des souches d'EST sont basées sur les propriétés biochimiques de la PrP^{Sc} en utilisant, par exemple, l'immunohistochimie ou la technique Western blot. Les profils immunohistochimiques des accumulations de la PrP^{Sc} dans le cerveau ont été utilisés pour différencier les maladies dues aux agents de la

tremblante de celle dues à l'agent de l'ESB (19). Beaucoup d'autres données sont nécessaires sur la corrélation entre les différentes méthodes de typage pour comprendre la caractérisation des souches de tremblante. La capacité à distinguer les souches de tremblante de l'agent (classique) de l'ESB est d'une importance particulière chez les petits ruminants en raison de la nature zoonotique de ce dernier, de l'exposition potentielle dans le passé des petits ruminants à l'agent d'origine alimentaire, de la ressemblance entre la tremblante et l'ESB expérimentale chez les petits ruminants et du seul cas confirmé d'ESB chez une chèvre en France (9). L'isolement de l'agent de l'ESB n'a cependant pas été rapporté à partir d'un mouton atteint d'EST et les données épidémiologiques semblent indiquer que pour autant que l'ESB existe chez le mouton, sa prévalence est indétectable par les programmes de dépistage classiques.

La mise en place de la surveillance active des maladies à prion chez les petits ruminants dans l'Union Européenne (UE) en 2002, et l'utilisation de techniques immunochimiques rapides agréées auparavant pour le dépistage de l'ESB chez les bovins ont apporté la preuve chez des moutons et des chèvres sains abattus en vue de la consommation humaine, ainsi que chez des animaux à l'équarrissage, de la présence de PrP^{Sc} qui n'avaient pas été détectée par les approches classiques d'échantillonnage ou les critères de diagnostic de la tremblante. De tels cas, dénommés familièrement « tremblante atypique », ont des caractéristiques communes avec le phénotype de la tremblante appelé Nor98 et existaient avant 2002 (12). La tremblante atypique a été identifiée chez des moutons résistants à la tremblante classique, y compris chez des moutons ayant des polymorphismes du gène *PrP* au niveau des codons 141, 154 et 171, et chez une chèvre (22).

La tremblante demeure enzootique dans beaucoup de pays européens et a aussi été signalée en Asie, en Afrique et en Amérique du Nord. En raison de l'absence de procédures de surveillance (passive) et de l'absence de surveillance active, le statut de nombreux pays vis-à-vis de la tremblante est inconnu. Certains pays n'ont jamais signalé la maladie sur la base d'une surveillance générale et/ou ciblée, alors que d'autres ont conservé leur statut de pays indemne pendant des périodes plus ou moins longue grâce à des politiques de prévention et de suivis. Ainsi, l'Australie et la Nouvelle-Zélande sont considérées indemnes depuis plus de 50 ans (31). Depuis janvier 1993, la tremblante est une maladie à déclaration obligatoire dans l'Union Européenne et de nombreux autres pays. La plupart des cas cliniques de tremblante surviennent chez les moutons âgés de 2 à 5 ans (17). Rarement, des cas se présentent chez des moutons de moins de 1 an. Dans le cas de tremblante atypique, un nombre non négligeable de cas a été signalé sur des moutons âgés de plus de 5 ans. Dans certains cas, la durée de vie commerciale du mouton peut être trop courte pour permettre à la maladie clinique de se développer. La tremblante a également été décrite chez des chèvres et le mouflon en captivité (*Ovis musimon*), un type primitif de mouton. La plupart des races de mouton sont affectées, bien que chez certaines races, il existe clairement une base génétique à la résistance ou à une faible prévalence de la maladie. Les dossiers d'élevage indiquent que la maladie semble en relation avec certaines lignées familiales. L'infection chez le mouton peut être transmise de la brebis à l'agneau durant la période allant de la parturition au sevrage. L'infection peut également passer entre moutons et chèvres issus de troupeaux différents, spécialement lorsque la parturition a lieu en milieux restreints. Les membranes fœtales sont considérées comme étant une source d'infection, mais des pâturages ou des bâtiments occupés auparavant par des moutons infectés peuvent aussi présenter un risque. Les animaux en incubation et même les animaux qui ne présentent aucun signe clinique peuvent être une source d'infection pour les autres.

Les risques biologiques associés aux épreuves de diagnostic de la tremblante paraissent limités, mais des précautions appropriées doivent être prises. L'existence de la tremblante naturelle chez le mouton domestique depuis plus de deux siècles et demi et l'échec de nombreuses enquêtes à montrer un lien épidémiologique entre la tremblante et les EST humaines, fournissent une indication forte que les risques sont négligeables pour les humains qui travaillent sur cet agent (5). Plus spécifiquement, la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) n'apparaît pas avec une fréquence plus grande chez ceux dont les activités offrent un contact les plus étroits avec l'agent que chez ceux des autres groupes de population. Cependant, l'extrême résistance chimique et physique de l'agent de la tremblante et le fait qu'il est transmissible expérimentalement par injection à un large spectre d'espèces mammifères, suggèrent la prudence de prévenir toute exposition humaine. En raison du lien, à présent établi, entre l'ESB et une forme variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ), l'ESB et les agents apparentés sont maintenant classés avec les EST humaines du fait des risques biologiques (voir Chapitre 2.4.6.). Bien que la tremblante dans les conditions naturelles soit exclue de cette classification, l'adoption de mesures de confinement similaires à celles utilisées pour les autres agents d'EST est recommandée lors de manipulations en laboratoire de tissus issus de cas de tremblante naturelle. Ceci est particulièrement pertinent dans les pays qui ont fait l'expérience de cas d'ESB enzootiques dans leur population bovine. Étant donné que les moutons ont pu être exposés aux mêmes aliments pour animaux contaminés et considérés comme la source de l'infection chez les bovins, les personnes travaillant en contact direct avec des tissus infectés doivent donc porter des vêtements et des équipements protecteurs personnels appropriés et observer les procédures recommandées de décontamination prévues pour les agents responsables des encéphalopathies spongiformes (voir Chapitre 2.4.6.). Il convient de détruire tout tissu contaminé ou matériel à usage unique selon une procédure appropriée sûre ; le matériel ré-utilisable doit être nettoyé et décontaminé selon des méthodes approuvées. Une telle approche garantit aussi que les tentatives de caractériser l'agent responsable de la tremblante ne soient pas compromises par une contamination croisée. La pertinence de ces mesures de précautions est renforcée par l'apparition de la tremblante atypique qui a été transmise expérimentalement à des moutons et des souris transgéniques exprimant le gène *PrP* ovin (23), mais pour laquelle on ne connaît pas le risque de transmission naturelle et le pouvoir pathogène pour l'homme.

B. LES TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Diagnostic de suspicion sur la base des signes cliniques

Les signes cliniques (26) commencent généralement insidieusement, souvent par des altérations comportementales qui sont évidentes seulement après des inspections répétées. Ces caractéristiques, de manifestation subtile, comprenant une confusion apparente, le maintien à l'écart du troupeau, un regard fixe, progressent vers une maladie nerveuse plus définie, fréquemment caractérisée par des signes de prurit et une ataxie ou une incoordination de la démarche. Soit le prurit soit l'ataxie émerge habituellement pour dominer l'évolution clinique. La mort peut survenir après une période plus courte pendant laquelle il présente de vagues signes nerveux ou peut même survenir sans signes prémonitoires.

La variété des noms qui ont été utilisés dans différentes langues pour décrire la tremblante, par exemple, la tremblante (*trembling*) (en anglais scrapie [la gratte]), *Traberkrankheit* [la maladie du trot] ou *Gnubberkrankheit* [la maladie du mordillement]), reflète la diversité de la présentation et des signes cliniques prédominant dans les différentes populations de moutons.

Le prurit est repéré principalement par l'action compulsive de l'animal à se frotter ou à se gratter contre des objets fixes, à se mordre la peau et à se gratter avec les pattes postérieures. La conséquence en est une perte de laine considérable, particulièrement sur le thorax latéral, les flancs et la croupe. La persistance du prurit entraîne le développement de lésions cutanées que s'inflige l'animal. Celles-ci peuvent apparaître dans les zones où la laine a été arrachée et sur la nuque, la face, les oreilles et les membres. Un « réflexe de mordillement » caractéristique peut souvent être déclenché par une palpation de la région lombaire, et peut aussi être suscité par les propres mouvements de grattage du mouton.

L'ataxie ou l'incoordination de la démarche est d'abord apparente sous la forme d'une maladresse à tourner avec des difficultés à positionner les membres postérieurs, fléchissant l'arrière-train alors que les membres antérieurs sautent ou vont au trot. Des trébuchements et des chutes surviennent, mais le mouton est généralement capable de recouvrer rapidement la position debout. Ces signes progressent vers un état de faiblesse et l'animal reste couché. Les informations sur les variants phénotypiques de la tremblante, appelés « tremblante atypique » ou Nor98, sont encore insuffisantes pour suggérer que ses signes cliniques sont différents de ceux de la tremblante classique, mais il a été signalé une prédominance de l'ataxie (20, 26). D'autres signes nerveux peuvent inclure les grincements de dents (bruxisme), un port de tête et des oreilles anormalement bas, des tremblements ténus, des convulsions et la cécité. Il peut aussi y avoir une hyperesthésie au son, au mouvement ou au toucher. Une polydipsie et une polyurie peuvent être manifestes. Dans la plupart des cas, il y a également une perte de la condition générale, mais une perte de poids significative peut n'être évidente que dans les stades cliniques tardifs.

La progression de la maladie clinique est très variable, et peut durer d'une semaine à plusieurs mois, avec une issue inévitablement fatale. Il existe aussi une variation des signes cliniques entre les individus et entre les différentes races de moutons. Ces variations peuvent être dues à l'influence du génotype de l'hôte et à la souche de l'agent. Les facteurs environnementaux peuvent également avoir une influence sur l'évolution de la maladie. Le diagnostic clinique des cas individuels de tremblante peut ainsi être difficile. Les signes cliniques peuvent, spécialement dans la phase précoce de la maladie, ressembler à ceux d'autres affections du mouton adulte. Celles-ci incluent : l'ectoparasitisme, la pseudorage (maladie d'Aujeszy), la rage, la listériose encéphalique, la pneumonie ovine progressive (maedi-visna), la toxémie de gestation (cétose), la tétanie d'herbage et les intoxications chimiques et par les plantes.

Des vidéo-clips montrant les signes cliniques de la tremblante sont disponibles sur le site web du Laboratoire de référence communautaire sur les EST de la Commission Européenne/Agence des laboratoires vétérinaires (*Veterinary Laboratories Agency*, VLA) (10). D'autres cassettes sur les symptômes de la tremblante classique peuvent également être visionnées (27), ainsi que des vidéo-clips sur la tremblante atypique (20).

2. Identification de l'agent pathogène

Selon l'hypothèse du « prion », la mise en évidence de PrP^{Sc} pourrait constituer l'identification de l'agent mais, la transmission à partir de tissus infectés, habituellement par injection à des rongeurs de laboratoire, est le seul moyen disponible de détection de l'infectivité. Les longues périodes d'incubation et l'échec de la transmission de certaines sources de tremblante naturelle à des lignées spécifiques de souris signifient que le critère de la transmissibilité ne peut être retenu pour le diagnostic. Cependant, la caractéristique biologique par transmission est un composant important pour la définition des nouveaux variants phénotypiques émergents et pour les approches discriminantes pour distinguer entre les cas de tremblante et ceux d'ESB chez les moutons et les chèvres (10).

Dans le passé et en l'absence de méthodes d'isolement de l'agent causal *in vitro*, le diagnostic de la tremblante (14) reposait sur la mise en évidence de changements pathologiques. En l'absence de lésions macroscopiques spécifiques, la seule méthode était la mise en évidence des lésions histologiques dans le SNC. Avant la détection

en routine de la PrP^{Sc} par des méthodes immunochimiques, la mise en évidence de la PrP pathologique sous forme de fibrilles associées à la tremblante (SAF = *scrapie-associated fibrils*) était employée comme appoint au diagnostic histopathologique. Les SAF sont visualisées sur des extraits non fixés de cerveau par microscopie électronique à coloration négative. La détection des SAF était particulièrement utile quand le matériel cérébral était autolysé.

Le diagnostic histopathologique était en général basé sur l'examen d'une seule coupe de la moelle prélevée au niveau de l'obex, qui est considéré comme le site de choix pour observer les changements morphologiques (29). L'examen immunohistochimique (IHC) sur des coupes de la moelle et les techniques Western blot réalisées sur des tissus frais adjacents ont été introduit après que la spécificité diagnostique de la PrP^{Sc} ait été reconnue et que l'efficacité des méthodes de détection ait été améliorée. Alors que les cas cliniques suspects de tremblante (quand des échantillons adéquates sont disponibles) doivent continuer à faire l'objet d'une recherche initiale des lésions histopathologiques, les critères de diagnostic doivent maintenant comprendre aussi la mise en évidence de la PrP^{Sc} dans le SNC. La détection de la PrP^{Sc} précède la vacuolisation et les signes cliniques, ce qui rend les tests immunologiques plus sensibles (16). Cette approche fournit aussi une aide dans la caractérisation de la protéine prion présente et contribue à la distinction entre les phénotypes cliniques, en particulier entre la tremblante classique et la tremblante atypique ainsi qu'avec l'ESB (2, 30).

Des méthodes rapides pour la détection de la PrP^{Sc}, disponibles dans le commerce, introduites au début pour le diagnostic de l'ESB sont aussi agréées pour le diagnostic de la tremblante (11). Il s'agit de méthodes Western blot ou d'épreuves immuno-enzymatiques (ELISA) (14). Ces tests rapides autorisent un dépistage préliminaire à partir duquel les résultats positifs ou douteux sont examinés à nouveau pour confirmation par des méthodes immunohistochimiques ou Western blot.

L'absence d'observation de changements histologiques caractéristiques ou de détection des PrP/SAF spécifiques ne constitue pas une preuve d'absence de la maladie ; la meilleure garantie d'exactitude réside dans l'accord entre les résultats de plusieurs approches de diagnostic. Il est évident que lors de dépistages en vue d'apporter la preuve que le pays est indemne de tremblante chez les petits ruminants, il peut se révéler nécessaire d'employer plusieurs critères de diagnostic et d'utiliser au moins deux techniques de laboratoire sur des échantillons du SNC correctement prélevés (histopathologie, immunohistochimie, ou immuno-empreintes) afin de maintenir un haut niveau de confiance dans les résultats négatifs.

La surveillance passive de la tremblante, comprenant l'examen de matériel du SNC à partir de cas cliniques suspects, a été, ces dernières années, complétée dans de nombreux pays par une surveillance active ciblant les animaux de réforme apparemment sains et les animaux retrouvés morts (maladies ou morts suspectes appelés aussi animaux à risque). La principale approche de la surveillance active a été l'utilisation *post mortem* des méthodes rapides sur du matériel SNC. Cependant, à l'encontre de ce qui se passe avec l'ESB, il est possible, dans le cas de la tremblante, de réaliser le dépistage sur d'autres tissus que le SNC des animaux morts car la large répartition de la PrP^{Sc} dans les tissus lymphoréticulés permet sa mise en évidence après biopsie de tissus lymphoréticulés périphériques facilement accessibles.

La mise en évidence de la PrP^{Sc} dans les tissus lymphoréticulés par immunohistochimie a été utilisée pour le diagnostic pré-clinique de la tremblante chez le mouton à partir des amygdales du palais, de la membrane nictitante, des nœuds lymphatiques superficiels et, plus récemment, de biopsies de la muqueuse rectale (15). L'application des techniques de détection de la PrP au diagnostic pré-clinique nécessite une meilleure compréhension de la variabilité de la pathogénie avant que ne soient établies leurs sensibilités relatives quant à la période d'incubation. En outre, il semble que dans certains cas occasionnels de tremblante du mouton, il n'y a pas de phase de réplication dans les tissus lymphoréticulés périphérique (1, 15). Alors que les dépistages à grande échelle pour déterminer si un pays est indemne de maladie doivent comprendre des examens ciblés des tissus périphériques des animaux les plus jeunes, la surveillance pour estimer la prévalence de la maladie pourrait potentiellement se limiter à l'examen de tissu du SNC des moutons adultes. Cependant, les enquêtes en vue d'estimer la prévalence de la maladie doivent prendre en compte un certain nombre de facteurs comme la stratification des élevages de mouton, le niveau d'infection au sein des troupeaux, la fréquence de la maladie et l'implication du système lymphoréticulé dans les différents génotypes, ainsi que l'effet de l'association génotype/souche de l'agent sur la période d'incubation.

Le besoin de différencier les cas de tremblante d'une éventuelle ESB chez les moutons et les chèvres a réclamé le développement de méthodes de diagnostic pouvant distinguer les agents entraînant ces infections. Des études suggèrent que la conformation de la PrP produite en cas d'ESB chez les moutons infectés est différente de celle de la PrP trouvée dans les cas naturels de tremblante (12, 19, 25). Ces différences de conformation peuvent être détectées par des techniques d'immuno-empreinte ou d'immunohistochimie utilisant des anticorps spécifiques des peptides. Dans l'Union Européenne, la stratégie pour réaliser cette distinction comprend l'examen, au cours d'une procédure en 3 temps, de matériel issu du SNC (après une détection initiale lors d'une surveillance active ou passive [dépistage initial]) (10). Elle se base sur l'utilisation d'une technique de Western blot capable d'une telle discrimination, suivie d'une évaluation et de recherches complémentaires par des méthodes biochimiques ou immunohistochimiques, et se termine, si nécessaire, par la transmission à un panel de souris (type sauvage) (voir Chapitre 2.4.6.). L'interprétation des résultats des méthodes *in vitro* (Western blot ou ELISA) dépend des différences observées au niveau du site de clivage N-terminal lors de digestion de la PrP^{Sc} par la protéinase K.

L'approche immunohistochimique *in situ* repose sur la distribution et les profils spécifiques des peptides de la PrP^{Sc} dans le cerveau et les tissus lymphoréticulés. Des souris transgéniques adaptées sont de plus en plus utilisées pour la caractérisation biologique des souches des agents, mais cette méthode manque du recul et des données obtenues avec les souris de type sauvage.

Le contrôle de qualité et l'assurance qualité sont des composantes essentielles des procédures de diagnostic et des conseils peuvent être obtenus auprès des Laboratoires de référence de l'OIE (30).

a) Préparation des tissus

Le problème de l'ESB chez les petits ruminants et, plus récemment, de la reconnaissance de la tremblante atypique a influencé les stratégies d'échantillonnage et de diagnostic. Bien qu'un échantillonnage le plus large possible et l'utilisation de plusieurs épreuves de diagnostic puissent pallier les éventuelles incertitudes lors du diagnostic de maladies à prion chez les petits ruminants, des facteurs opérationnels déterminent aussi ce qui est techniquement et économiquement possible. La mise en œuvre des programmes de surveillance passive ou active ainsi que les méthodes de diagnostic employées ont aussi une influence sur la stratégie d'échantillonnage. Le choix et la recommandation des méthodes doivent donc constamment être révisés.

Pour le diagnostic de routine, le matériel prélevé est le SNC conservé soit frais, soit congelé pour les tests biochimiques ultérieurs, soit encore fixé en vue de l'histologie. Lorsque des programmes sont mis en œuvre pour identifier d'éventuelles infections ESB chez les petits ruminants, tous les échantillons doivent être prélevés aseptiquement à l'aide d'instruments à usage unique ou d'instruments stérilisés dans les conditions spécifiques à la décontamination des prions (voir Chapitre 2.4.6.). Il convient d'éviter les contaminations croisées lors des autopsies. Par conséquent, dans les procédures qui suivent et lorsque des tissus frais sont prélevés, une partie aliquote doit être réservée si nécessaire pour les études de transmission. Bien que la maladie puisse souvent être diagnostiquée sur du matériel autolysé ou conservé dans de mauvaises conditions, de tels échantillons ne peuvent fournir que des preuves limitées en ce qui concerne l'absence de la tremblante.

Les moutons pour lesquels la maladie clinique est suspectée (surveillance passive) doivent être tués par injection intraveineuse de barbituriques et le cerveau doit être prélevé selon les procédures normalisées de nécropsie dès que possible après le décès. Il est conseillé de retirer le cerveau dans son intégralité afin de permettre les examens pathologiques nécessaires pour différencier les différents phénotypes d'EST d'une part, et pour assurer, d'autre part, un diagnostic différentiel avec les désordres nerveux non liés à une EST. Les méthodes de recoupe des tissus du cerveau pour l'application de la détection de la PrP – qui requiert du tissu frais – et pour les techniques histologiques dépendent des sensibilités optimales de chacune des épreuves pour les différentes aires du cerveau et le compromis que précisément une même aire ne peut pas être utilisée pour les différentes approches (tissus frais, congelés ou fixés) à la fois. Le protocole suivant est suggéré, mais pourrait faire l'objet de modifications afin de satisfaire le portefeuille spécifique des tests appliqués. Des informations complémentaires sont disponibles auprès des Laboratoires de référence de l'OIE (10, 30).

Dès le début, un fragment de la moelle cervicale comprenant l'obex (voir Chapitre 2.4.6., « ESB », Figure 1) est prélevé et fixé dans une solution saline à 10 % de formol pendant 3 à 5 jours avant section et inclusion dans de la paraffine en vue des examens histopathologiques ou immunohistochimiques. Un soin particulier doit être pris pour garantir que les échantillons destinés à l'immunohistochimie et à l'examen histopathologique ne soient pas congelés. Pour la détection de la PrP (ou des fibrilles associées à la tremblante), des échantillons de tissus frais sont prélevés et stockés congelés avant l'extraction (température ≤ -20 °C). Les échantillons doivent comprendre approximativement 5 g de tissu prélevé au niveau de la moelle épinière caudale et, si nécessaire, au niveau du tronc cérébral immédiatement en avant de la moelle (échantillon de l'obex). Pour permettre l'utilisation de plusieurs techniques biochimiques, une division de ce tissu peut être réalisée soit par une hémisection dans le plan médian soit par une section transverse. Des variations du protocole d'échantillonnage pour les tests rapides sont décrites ci-dessous dans le cadre des approches de surveillance active. Quand tout le cerveau et disponible, des échantillons supplémentaires sont préconisés afin de minimiser le risque de diagnostics faux-négatifs, en tenant compte de la possibilité qu'il puisse exister un ciblage souche-spécifique des autres parties du cerveau. Dans le cas de tremblante atypique, par exemple, ceux-ci peuvent être prélevés dans le cervelet, le thalamus ou les régions du Noyau gris central, qui constituent des sites supplémentaires utiles pour les tests.

Les tissus cérébraux restant sont fixés dans environ 10 fois leur volume de formol salin à 10 %, pendant au moins 1 semaine, puis coupés transversalement comme cela est requis pour obtenir des blocs destinés à l'inclusion dans la paraffine. L'échantillonnage initial d'un seul bloc de moelle peut être suffisant pour le diagnostic immunohistochimique ou morphologique (voir Chapitre 2.4.6., « ESB », Figure 1). Les échantillons pour la caractérisation phénotypique ou le diagnostic différentiel peuvent être obtenus en prélevant dans des aires supplémentaires du tronc cérébral, et si nécessaire, des blocs représentatifs de toutes les régions majeures du cerveau. Les sections, coupées à une épaisseur de 5 µm, sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine et sont examinées pour d'éventuels changements morphologiques et, quand de besoin, pour la détection immunohistochimique de la PrP^{Sc}, comme décrit ci-dessous.

Pour les programmes de surveillance active, les méthodes de récupération du tronc cérébral par le *foramen magnum* à l'aide d'un instrument approprié en forme de cuillère, identiques à celles employées chez les bovins dans le cas de l'ESB (voir Chapitre 2.4.6., « ESB », Figure 2), ont été adaptées au mouton. Cette approche peut être utilisée pour le cas cliniques suspects, mais elle n'est pas conseillée. L'échantillon minimum est le tronc cérébral au niveau de l'obex et le cervelet quand il est nécessaire de diagnostiquer aussi la tremblante atypique. Le tronc cérébral est divisé par une section dans le plan médian pour obtenir deux moitiés ; l'une fraîche/congelée pour un test rapide, l'autre fixée pour l'histopathologie. Il est aussi possible de fixer une section coronale comprenant l'obex et de garder une section adjacente similaire de la moelle caudale pour le test rapide. Dans le passé, il était recommandé d'utiliser une section coronale complète pour vérifier la symétrie des lésions morphologiques, mais avec l'arrivée des techniques moléculaires, une compétition s'est établie entre les techniques pour la détermination du meilleur site à prélever en vue du diagnostic. Certains tests rapides utilisent une approche d'échantillonnage au centre afin d'obtenir une quantité suffisante de matériel à partir de la région de l'obex. Même si l'hémisection du tronc cérébral au niveau de la région de l'obex ne permet plus de vérifier la symétrie des lésions vacuolaires, la plus grande spécificité de l'immunohistochimie dans la détection de la PrP^{Sc} compense largement cet inconvénient. Cependant, si cette technique est utilisée ou si on applique une approche d'échantillonnage par le centre, il devient difficile d'assurer l'intégrité des sites cibles latéraux. Le noyau dorsal du nerf vague (la zone cible optimale dans la plupart des cas de tremblante) se présente sous forme d'une colonne étroite proche de la ligne médiane (voir Chapitre 2.4.6., « ESB », Figure 3). Le choix dépend aussi des instruments spécifiques fournis par le fabricant du kit de diagnostic). Quelque soit la méthode de prélèvement, il est crucial que les opérateurs soient formés et que la formation comprenne des indications sur l'anatomie du tronc cérébral lors de sections et sur la localisation précise des zones cibles dans lesquelles on peut trouver une accumulation de PrP^{Sc} spécifique de la maladie.

Pour distinguer les cas de tremblante classique des cas de tremblante atypique, il est nécessaire de faire appel à des parties du cervelet soit fixées soit fraîches/congelées.

b) Examen histologique

Les changements pathologiques dans le SNC sont ceux d'une encéphalopathie spongiforme notamment la vacuolisation des péricaryons et des neuropiles neuronales associée à une gliose variable, mais souvent peu nette (en particulier une réaction astrocytaire). Typiquement, les lésions ont une distribution bilatérale et symétrique. Il y a une variabilité considérable dans le type de distribution de la vacuolisation et des autres changements, mais les lésions, au moins dans les cas de tremblante classique, sont généralement plus apparentes dans le tronc cérébral et affectent fréquemment le noyau dorsal du nerf vague. La vacuolisation des péricaryons neuronales n'est pas pathognomonique car elle souvent présente dans le cerveau de moutons apparemment sains, quoique peu étendue (28). De récents arguments suggèrent que les patterns de la vacuolisation sont influencés par la souche de l'agent et les génotypes de l'hôte, bien que d'autres facteurs de l'hôte, indépendants de ces deux variables, aient aussi une influence considérable (6, 54). Il est donc improbable que seul le type de distribution de la vacuolisation puisse permettre l'identification de la souche de tremblante comme cela est traditionnellement réalisé chez la souris. De plus, aucun des caractères pathologiques de la tremblante pris individuellement ne peut être considéré comme strictement spécifique, mais en combinaison et en présence de changements vacuolaires abondants, ils sont indubitablement pathognomoniques. La sévérité des signes cliniques n'est pas nécessairement reflétée par l'intensité des lésions. Parallèlement, même si des signes cliniques sévères sont observés, les changements morphologiques peuvent être virtuellement indétectables en microscopie optique (3, 13). Ainsi, un diagnostic clinique d'une suspicion de tremblante ne peut être réfuté par l'impossibilité de trouver des changements vacuolaires significatifs dans le cerveau. L'absence de lésions n'apporte donc pas la preuve de l'absence de l'infection, puisque celle-ci peut survenir sans signe clinique ou sans changement morphologique.

En dépit de ces réserves, l'examen histologique de sections de moelle au niveau de l'obex peut être suffisant pour confirmer un diagnostic dans la plupart des cas de suspicion de tremblante clinique (14, 29). Alors que ceci est utilisé avec succès dans le diagnostic de routine de la tremblante classique, des observations équivoques dans la moelle nécessiteront l'examen de sections supplémentaires du SNC. Ceci est devenu particulièrement vrai depuis l'identification de la tremblante atypique, dans laquelle les changements morphologiques dans le cerveau peuvent être rares voire absents, et pour laquelle la mise en évidence de la PrP^{Sc} n'est possible que dans certains sites en dehors du tronc cérébral. Il est clair que pour établir avec un degré de confiance élevé l'absence de lésions, il convient d'examiner un grand nombre de zones représentatives de l'ensemble du cerveau.

c) Détection des formes de la PrP spécifique de la maladie

Les méthodes pour démontrer l'accumulation des formes de la PrP spécifique de la maladie dans des zones cibles précises représentent à présent la principale approche pour le diagnostic de la tremblante (14). L'association de l'immunohistochimie et du Western blotting est préconisée pour la confirmation du diagnostic dans les cas cliniques suspects. L'immunohistochimie sur des coupes de tissu en vue de mettre en évidence l'accumulation de PrP^{Sc} doit être réalisée en parallèle avec l'histologie sur les cas suspects. La forme tronquée partiellement résistante à la protéase de la PrP, la PrP^{res}, peut aussi être détectée par électrophorèse et immuno-empreinte après purification partielle d'extraits au détergent de tissu cérébral affecté, non fixé et traité à la protéase. L'association de l'immunohistochimie et du Western blotting est aussi recommandée lorsque les lésions histologiques sont peu sévères et considérées comme douteuses. Lors de programmes de surveillance active, le premier diagnostic sera généralement effectué à l'aide d'un test rapide et, en cas de résultats positif ou douteux, des méthodes de confirmation doivent être appliquées. Les techniques de diagnostic sont détaillées sur les sites web des Laboratoires de référence de l'OIE (voir Chapitre 2.4.6.).

- **Méthodes immunohistochimiques**

La mise en évidence la PrP spécifique de la maladie dans des cerveaux affectés par la tremblante est réalisée en immunohistochimie sur du matériel fixé au formol par utilisation de plusieurs techniques visant à démasquer les épitopes et en appliquant des anticorps anti-PrP appropriés (10, 30). La mise en évidence de configurations morphologiques immuno-marquées spécifiques de la maladie, leurs associations avec les cellules et leurs profils de distribution neuro-anatomique fournit la base du diagnostic de confirmation dans les cas de tremblante tant classique (21) qu'atypique (4).

- **Méthodes Western blot**

Le diagnostic basé sur la détection de la PrP^{res} par Western-blot requiert qu'une large région des bandes immunomarquées, correspondant aux protéines de 27 à 30 kDa de masse moléculaire, soient présentes que dans les lignes d'échantillons de tremblante traités à la protéinase K et que les lignes d'échantillons contrôles fournissent les comparaisons appropriées. Plusieurs techniques sensibles de Western blot pour la détection de la PrP^{res} ont été publiées (24). La technique originale utilisée pour le diagnostic de l'ESB, qui a été désignée comme la « technique de western-blot de l'OIE » (10), repose sur une extraction à l'aide de détergents d'une grande quantité de matériel cérébral frais (4 g) suivie par une ultracentrifugation pour concentrer la PrP et ensuite par un traitement avec l'enzyme protéinase K pour digérer toutes les protéines normales de l'hôte. Ceci ne laisse plus que la PrP^{res} à être liée par un anticorps spécifique et un système de détection dans les échantillons de cerveaux positifs (voir Chapitre 2.4.6.).

Si les examens histopathologique et immunohistochimiques ne peuvent être réalisés en raison du mauvais état de l'échantillon (tissus très autolysés), les techniques d'immuno-empreinte, l'ELISA et la détection des SAF restent les seules épreuves disponibles. Mais ces techniques ne peuvent pas être réalisées dans tous les cas, notamment lorsque le tissu cérébral prévu pour la fixation et l'examen histologique a été congelé par erreur à l'autopsie. Les techniques IHC peuvent être appliquées dans de tels cas, mais la bonne identification des sites anatomiques risque d'être compromise et un résultat « négatif » doit être vérifié. Avec une modification, la méthode de détection des SAF peut être aussi appliquée avec succès sur des tissus fixés formolés (7). La détection des SAF ne doit pas être le seul test utilisé si une méthode immuno-chimique est possible.

Une gamme étendue d'antisérums et d'anticorps monoclonaux pour la détection de la PrP par les méthodes immuno-chimiques est maintenant utilisée et certains sont disponibles commercialement. Les témoins positifs et négatifs sont essentiels.

- **Méthode des tests rapides**

Des tests rapides d'immunodiagnostic pour la détection de la PrP^{Sc} dans le tissu cérébral des petits ruminants ont été développés et évalués quant à leur capacité diagnostique (11). Les tests rapides reposent sur l'optimisation des réactifs utilisés pour l'extraction et la digestion ainsi que sur la détection grâce à un anticorps monoclonal, ce qui ne justifie plus le recours à de longues étapes d'ultracentrifugation. Les tests nécessitent des échantillons frais de moelle au niveau de l'obex ou juste en arrière de l'obex. Pour les tests les plus rapides, il n'est besoin que de 0,5 g de tissu et des instruments de prélèvement ont été créés pour prélever les quantités exactes. Cependant, afin de permettre d'éventuels tests supplémentaires, il est conseillé de prélever au moins 1 g de tissu ou la totalité du cerveau. Certains laboratoires utilisent la technique Western blot de l'OIE (si une quantité suffisante de tissu est disponible) pour confirmer tout échantillon faiblement positif qui aurait réagi initialement avec un test rapide (10). L'augmentation de la quantité ou de la concentration de PrP^{res} extraite par ultracentrifugation à partir de la partie aliquote de tissu cérébral peut améliorer la sensibilité. Les méthodes basées sur les tests rapides ont été utilisées pour identifier des cas de tremblante atypique (12) et la détection est optimale si des échantillons appropriés (en l'occurrence le cerveau) sont soumis à l'épreuve.

Les perspectives d'avenir pour des tests de diagnostic de la tremblante et des autres EST plus sensibles reposent sur le raffinement des méthodes existantes et le développement de nouvelles approches pour détecter les formes de PrP spécifiques de la maladie. Il est essentiel d'obtenir des performances pertinentes pour les tests rapides utilisés pour le diagnostic primaire, notamment en ce qui concerne la capacité de ces tests à reconnaître à la fois les deux phénotypes de la tremblante (classique et atypique). La sensibilité générale du diagnostic dépend en grande partie de la précision du prélèvement.

c) Autres épreuves de diagnostic

Comme dans le cas de l'ESB (voir Chapitre 2.4.6.), des tests manquent qui pourraient être réalisés sur les animaux vivants pour identifier les cas de tremblante au cours des premiers stades de l'incubation en dépit de plusieurs voies de recherche. La recherche de bio-marqueurs qui seraient des protéines non-prion, notamment par les approches de la protéomique ou de la métabolomique, pourrait offrir des pistes ; il y a, toutefois, des contraintes comme le fait que les tissus soient accessibles et que la spécificité soit démontrée.

2. Épreuves sérologiques

Une réponse immunitaire sérologique à la tremblante n'a pas été détectée.

3. Criblage génétique

Des stratégies de contrôle et d'élimination de la tremblante sur la base de la sélection génétique de la résistance à la tremblante classique ont été mises en œuvre dans certains pays. La sélection est réalisée sur la détermination des polymorphismes courants du gène de la *PrP* du mouton. Le génotypage du gène *PrP* peut donc être utilisé comme une aide au contrôle de la tremblante classique : les géniteurs, en particulier les béliers, possédant un génotype de la *PrP* approprié peuvent être sélectionnés de façon à obtenir une progéniture ayant un risque réduit de développer la maladie (8). De tels services de génotypage sont disponibles sur une base commerciale en Amérique du Nord et dans plusieurs pays en Europe. Le test est réalisé avec de l'ADN extrait des globules blancs obtenus à partir de prélèvements de sang traités à l'aide d'acide tétra-acétique éthylène diamine (EDTA). La sélection peut se faire sur les géniteurs les plus résistants à la tremblante, homozygote pour l'arginine au codon 171, ce qui réduit l'incidence de la tremblante classique dans un troupeau. Ces animaux ne sont pas communs dans la plupart des troupeaux et dans certaines races ce génotype est en fait absent.

Une approche stratégique pour éradiquer l'infection de la tremblante des troupeaux nationaux ou de zones géographiques, qui se baserait sur l'adoption d'un programme national de sélection génétique similaire, est probablement prématurée. La pénurie de moutons homozygotes pour l'arginine au codon 171 est un facteur. Le manque de données sur les effets d'une forte prévalence d'un tel génotype sur la productivité, la résistance aux maladies autres que la tremblante et la viabilité en général est un autre facteur. En outre, les connaissances sur l'épidémiologie et la prévalence de la tremblante atypique sont encore insuffisantes. Les décisions sur la justesse de tels programmes doivent prendre en compte une évaluation approfondie de la situation de la tremblante qui prévaut aux niveaux national ou régional, la disponibilité de moutons résistants de remplacement, la réglementation en matière d'importation, la disponibilité des services de génotypage et les aspirations de la filière ovine et l'appui à lui apporter ; il importe en particulier d'évaluer la volonté des éleveurs à s'impliquer dans un programme à long terme.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Aucun vaccin ni aucun produit biologique ne sont disponibles actuellement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANDREOLETTI O., BERTHON P., MARC D., SARRADIN P., GROSCLAUDE J., VAN KEULEN L., SCHELCHER F., ELSSEN J.M. & LANTIER F. (2000). Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol.*, **81**, 3115–3126.
2. BARON T., BIACABE A.G., ARSAC J.N., BENESTAD S. & GROSCHEP M.H. (2006). Atypical transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ruminants. *Vaccine*, **30**, 5625–5630.
3. BEGARA-MCGORUM I., CLARK A.M., MARTIN S. & JEFFREY M. (2000). Prevalence of vacuolar lesions consistent with scrapie in the brains of healthy cull sheep of the Shetland Islands. *Vet. Rec.*, **147**, 439–441.

4. BENESTAD S.L., SARRADIN P., THU B., SCHONHEIT J., TRANULIS M.A. & BRATBERG B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec.*, **153**, 202–208.
5. BROWN P. (1992). Infectious cerebral amyloidosis: clinical spectrum, risks and remedies. *In: Transmissible Spongiform Encephalopathies – Impact on Animal and Human Health*. Brown F., ed. Basel, Karger, *Dev. Biol. Stand.*, **80**, 91–101.
6. BRUCE M.E., BOYLE A. & MCCONNELL I. (2004). TSE strain typing in mice. *In: Techniques in Prion Research*, Lehmann S. & Grassi J., eds. Birkhäuser Verlag, Switzerland, 132–146.
7. CHAPLIN M.J., ALDRICH A.D. & STACK M.J. (1998). Scrapie associated fibril detection from formaldehyde fixed brain tissue in natural cases of ovine scrapie. *Res. Vet. Sci.*, **64**, 41–44.
8. DAWSON M., HOINVILLE L.J., HOSIE B.D. & HUNTER N. (1998). Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Vet. Rec.*, **142**, 623–625.
9. ELOIT M., ADJOU K., COULPIER M., FONTAINE J.J., HAMEL R., LILIN T., MESSIAEN S., ANDREOLETTI O., BARON T., BENCSIK A., BIACABE A.G., BERINGUE V., LAUDE H., LE DUR A., VILOTTE J.L., COMOY E., DESLYS J.P., GRASSI J., SIMON S., LANTIER F. & SARRADIN P. (2005). BSE agent signatures in a goat. *Vet. Rec.*, **156**, 523–524.
10. EUROPEAN COMMISSION (EC). TSE Community Reference Laboratory – Web Resources. <http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-tse-rl-web.htm>
11. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2005a). Evaluation of rapid post-mortem TSE tests intended for small ruminants. EFSA Scientific Report, **49**, 1–16.
12. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2005b). Opinion on classification of atypical transmissible spongiform encephalopathy (TSE) cases in small ruminants, **276**, 1–30.
13. FRASER H. (1976). The pathology of natural and experimental scrapie. *In: Slow Virus Diseases of Animals and Man*. Kimberlin R.H., ed. North-Holland, Amsterdam, The Netherlands, 267–305.
14. GAVIER-WIDEN D., STACK M.J., BARON T., BALACHANDRAN A. & SIMMONS M. (2005). Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 509–527.
15. GONZALEZ L., DAGLEISH M.P., BELLWORTHY S., SISÓ S., STACK M.J., CHAPLIN M.J., DAVIS L.A., HAWKINS S.A.C., HUGHES J. & JEFFREY M. (2006). Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa. *Vet. Rec.*, **158**, 325–331.
16. HAMIR A.N., MILLER J.M., SCHMERR M.J., STACK M.J., CHAPLIN M.J. & CUTLIP R.C. (2001). Diagnosis of preclinical and subclinical scrapie in a naturally infected sheep flock utilizing currently available post mortem diagnostic techniques *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 152–154.
17. HOINVILLE L.J. (1996). A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15**, 827–852.
18. HÖRNLIMANN B. (2006). Prions in Humans and Animals, Hörnlimann B., Riesner, D. & Kretzschmar H., eds. de Gruyter, Berlin, Germany.
19. JEFFREY M., MARTIN S., GONZALEZ L., RYDER S.J., BELLWORTHY S.J. & JACKMAN R. (2001). Differential diagnosis of infections with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep. *J. Comp. Pathol.*, **125**, 271–284.
20. KONOLD T., DAVIS A., BONE G.E., BRACEGIRDLE J., EVERITT S., CHAPLIN M., SAUNDERS G.C., CAWTHRAW S. & SIMMONS M.M. (2007). Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report. *BMC Vet. Res.*, **3**, 2–23.
21. RYDER S.J., SPENCER Y.I., BELLERBY P.J. & MARCH S.A. (2001). Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet. Rec.*, **148**, 7–13.
22. SEUBERLICH T., BOTTERON C., BENESTAD S., BRÜNISHOLZ H., WYSS R., KIHM U., SCHWERMER H., FRIESS M., NICOLIER A., HEIM D. & ZURBRIGGEN A. (2007). Atypical scrapie in a Swiss goat and implications for transmissible spongiform encephalopathy surveillance. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **19**, 2–8.

23. SIMMONS M.M., KONOLD T., SIMMONS H.A., SPENCER Y.I., LOCKEY R., SPIROPOULOS, J., EVERITT S. & CLIFFORD, D. (2007). Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Vet. Res.*, **3**, 20.
24. STACK M.J. (2004). Western Immunoblotting Techniques for the Study of Transmissible Spongiform Encephalopathies. *In: Techniques in Prion Research*, Lehmann S. & Grassi J., eds. Birkhäuser Verlag, Switzerland, 97–116.
25. STACK M., JEFFREY M., GUBBINS S., GRIMMER S., GONZALEZ L., MARTIN S., CHAPLIN M., WEBB P., SIMMONS M., SPENCER Y., BELLERBY P., HOPE J., WILESMITH J. & MATTHEWS D. (2006). Monitoring for bovine spongiform encephalopathy in sheep in Great Britain, 1998–2004. *J. Gen. Virol.*, **87**, 2099–2107.
26. ULVUND M.J. (2006). Clinical findings in scrapie. *In: Prions in Humans and Animals*, Hörnlimann B., Riesner D. & Kretzschmar H., eds. de Gruyter, Berlin, Germany, 398–407.
27. WELLS G.A.H. & HAWKINS S.A.C. (2004). Animal models of transmissible spongiform encephalopathies: experimental infection, observation and tissue collection. *In: Techniques in Prion Research*. Lehmann S. & Grassi J., eds. Birkhäuser Verlag, Switzerland, 37–71.
28. WELLS G.A.H., RYDER S.J. & HADLOW W.J. (2006). The pathology of prion diseases in animals. *In: Prions in Humans and Animals*. Hörnlimann B., Riesner D. & Kretzschmar H., eds. de Gruyter, Berlin, Germany, 315–327.
29. WOOD J.L.N., MCGILL I.S., DONE S.H. & BRADLEY R. (1997). Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982–1991. *Vet. Rec.*, **140**, 167–174.
30. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). OIE Expertise – Reference Laboratories.
http://www.oie.int/eng/OIE/organisation/en_LR.htm
31. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). World Animal Health Information Database (WAHID), Disease Information/ Scrapie.
http://www.oie.int/wahid-prod/public.php?page=disease_status_lists&disease_id=53

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la tremblante (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).

CLAVELÉE ET VARIOLE CAPRINE

RÉSUMÉ

La clavelée et la variole caprine sont des maladies virales affectant les ovins et les caprins. Elles se caractérisent par une hyperthermie, une éruption généralisée de papules ou de nodules, des vésicules (rares), des lésions internes (particulièrement au niveau des poumons), et peuvent se terminer par la mort. Ces deux maladies sont dues à des souches de capripoxvirus, qui peuvent infecter indifféremment les ovins et les caprins. Bien que la plupart des souches étudiées entraînent une maladie plus sévère selon l'espèce, on a isolé quelques souches dont le pouvoir pathogène est identique pour les deux espèces. Il a été suggéré d'englober sous le terme d'infection à capripox, la clavelée, la variole caprine, la variole ovine-caprine du Kenya, la dermatite caprine indienne et les formes nodulaires de clavelée et de variole caprine d'Afrique du Nord.

L'infection à capripox est enzootique en Afrique au nord de l'équateur, au Moyen-Orient, en Turquie, en Iran, en Afghanistan, au Pakistan, en Inde, au Népal, dans certaines régions de la République Populaire de Chine, et, depuis 1984, au Bangladesh. Récemment, l'infection a fréquemment fait des incursions dans le sud de l'Europe.

Identification de l'agent pathogène : *au laboratoire, la façon la plus rapide de confirmer une infection à capripox consiste à détecter les virions caractéristiques de l'infection à capripox à l'aide d'un microscope électronique à transmission. Le diagnostic de l'infection à capripox prend également en compte les commémoratifs d'infection généralisée par un capripox. Le virion de capripox est distinct de l'autre poxvirus infectant couramment les ovins et les caprins – un parapoxvirus responsable de l'ecthyma contagieux du mouton. Un antigène précipitant peut être identifié par la méthode d'immunodiffusion en gélose (IDG), à partir d'un prélèvement de nœud lymphatique effectué en phase précoce de l'infection à capripox, et de sérums immuns spécifiques ; cependant, il existe des réactions croisées avec le parapoxvirus. Un capripoxvirus se multipliera en culture tissulaire d'origine ovine, caprine, ou bovine, même si les isolats sauvages peuvent nécessiter jusqu'à 14 jours pour se multiplier, ou un, voire plusieurs passages supplémentaires en culture tissulaire. Le virus entraîne des inclusions intracytoplasmiques nettement visibles après coloration à l'hématoxyline-éosine. L'antigène peut également être détecté en culture tissulaire à l'aide de sérums spécifiques, et des techniques d'immunoperoxydase et d'immunofluorescence. L'antigène du capripoxvirus et les corps d'inclusion sont visibles sur des coupes congelées ou des coupes de paraffine colorées de lésions prélevées avant ou après la mort de l'animal.*

Une méthode immuno-enzymatique de détection de l'antigène (ELISA) utilisant un sérum polyclonal de détection dirigé contre un antigène immunodominant recombinant de capripoxvirus a été développée. Une détection du génome utilisant des amorces spécifiques de capripoxvirus pour le gène de la protéine de fusion et le gène de la protéine d'attachement ont également été décrits.

Épreuves sérologiques : *l'épreuve de séroneutralisation virale est l'épreuve sérologique la plus spécifique, mais, l'immunité contre une infection à capripox est surtout à médiation cellulaire. L'épreuve n'est donc pas suffisamment sensible pour identifier les animaux ayant été en contact avec le virus et qui n'ont élaboré que de faibles quantités d'anticorps neutralisants. Les épreuves d'immunodiffusion en gélose (IDG) et d'immunofluorescence indirecte sont moins spécifiques du fait des réactions croisées des anticorps dirigés contre d'autres poxvirus. La méthode du Western blot se basant sur la réaction entre l'antigène P32 du capripoxvirus avec*

les sérums à analyser est à la fois sensible et spécifique, mais elle est coûteuse et difficile à mettre en œuvre. L'utilisation en ELISA de cet antigène exprimé par un vecteur approprié, constitue une épreuve sérologique de référence acceptable.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique
: des vaccins à virus vivant et inactivé ont été utilisés pour lutter contre l'infection à capripox. Toutes les souches étudiées jusqu'à présent ont un important site de neutralisation en commun, et protègent les unes contre les autres. Les vaccins à virus inactivé procurent au mieux une immunité à court terme.

A. INTRODUCTION

La clavelée et la variole caprine (infections à capripox) sont enzootiques en Afrique du nord et du centre, au Moyen-Orient, et en Inde. Elles sont dues à des souches de capripoxvirus. Elles entraînent une maladie caractéristique du point de vue clinique chez les races d'ovins et de caprins extrêmement sensibles, et est habituellement difficile à confondre avec une autre maladie. Chez les animaux indigènes, la maladie est rarement généralisée ou mortelle, bien qu'elle puisse se manifester sous ces formes dans des régions ou des villages où elle est restée longtemps absente, à l'occasion d'un passage à l'élevage intensif ou en association avec d'autres agents infectieux, comme le virus de la peste des petits ruminants ou le virus de la fièvre aphteuse.

Les infections à capripox gênent considérablement l'introduction de races exotiques d'ovins et de caprins, ainsi que le développement de l'élevage intensif. Des souches de capripoxvirus responsables de la dermatose nodulaire contagieuse (comme la souche Neethling) affectent les bovins, mais rien ne prouve que ces souches ne puissent infecter les ovins et les caprins dans les conditions naturelles. La répartition géographique de la dermatose nodulaire contagieuse et celle de la clavelée et de la variole caprine sont différentes.

Les souches de capripoxvirus circulent entre les ovins et les caprins, mais la plupart entraînent des signes cliniques plus sévères chez l'une ou l'autre des espèces ; d'autre part, ces souches peuvent se recombiner et présenter alors un spectre d'hôtes intermédiaire et plusieurs niveaux de virulence. Certaines souches ont un effet pathogène équivalent chez les ovins et les caprins. L'infection à capripox peut s'étendre et s'établir dans de nouveaux pays. En 1983, elle s'est étendue à l'Italie, en 1985 et 1989 à Chypre, et en 1988 et à de nombreuses occasions par la suite à la Grèce, mais elle ne s'est établie dans aucun de ces pays. En revanche, en 1984 elle s'est étendue au Bangladesh où elle a persisté. Lors des dix dernières années, d'autres incursions fréquentes en Grèce et en Bulgarie ont été signalées. En 2005, un foyer d'infection à capripox au Vietnam laisse penser que l'aire de distribution de cette dernière est beaucoup plus grande que ce qui était précédemment reconnu.

La période d'incubation varie de 8 à 13 jours après que l'animal sensible ait été en contact avec un animal infecté. Elle peut être réduite à 4 jours si l'infection est expérimentale : par inoculation intradermique ou par transmission mécanique par des insectes. Certaines races européennes de moutons, comme celle de Soay, peuvent mourir d'une infection aiguë avant même de développer des lésions cutanées. Chez d'autres races, la température rectale commence par augmenter et dépasse 40 °C, puis, 2 à 5 jours plus tard, des taches apparaissent en premier – petites zones érythémateuses bien délimitées qui sont plus visibles sur la peau non-pigmentée, et qui évoluent en papules – épaississements cutanés indurés de 0,5 à 1 cm de diamètre, qui peuvent recouvrir tout le corps ou se limiter au museau, à l'ars ou au périnée. Les papules peuvent être couvertes de vésicules remplies de liquide, mais ceci reste rare. Une forme d'infection à capripox hémorragique sans épaississement cutané a été observée chez certaines races européennes de caprins. Dans ce cas, toutes les papules se rejoignent à la surface du corps, et cette forme de la maladie est toujours mortelle.

24 h après l'apparition des papules généralisées, les animaux affectés présentent une rhinite, une conjonctivite, et une hypertrophie des nœuds lymphatiques, plus particulièrement des préscapulaires. Les papules sur les paupières entraînent une blépharite plus au moins sévère. Les papules sur les muqueuses oculaires et buccales s'ulcèrent, le jetage et le larmolement décharges deviennent alors mucopurulents, et la muqueuse de la bouche, de l'anus, et du prépuce ou du vagin se nécrosent. La respiration devient laborieuse et bruyante du fait de la pression exercée au niveau de la partie supérieure de l'appareil respiratoire par l'hypertrophie des nœuds lymphatiques rétropharyngiens, et du fait de l'apparition de lésions sur les poumons.

Si la mort de l'animal n'intervient pas pendant cette phase aiguë de la maladie, les papules commencent à se nécroser du fait de l'ischémie qui fait suite à des embolies vasculaires à la base des papules. Au cours des 5 à 10 jours qui suivent, les papules forment des croûtes qui persistent jusqu'à 6 semaines, et laissent de petites cicatrices. Ces lésions cutanées peuvent être attaquées par les mouches, et une pneumonie

secondaire est courante. L'anorexie est rare, sauf si des lésions buccales empêchent l'animal de se nourrir. L'avortement est rare.

Lors de l'autopsie d'un animal gravement atteint, les lésions cutanées sont souvent moins visibles que de son vivant. Les muqueuses apparaissent nécrosées et tous les nœuds lymphatiques du corps sont hypertrophiés et œdémateux. Les papules, qui sont éventuellement ulcérées, peuvent être présentes au niveau de la muqueuse de la caillette, et parfois sur la paroi du rumen et du gros intestin, sur la langue, le palais et le voile du palais, la trachée et l'œsophage. Des zones plus claires d'environ 2 cm de diamètre peuvent, dans certains cas, être observées sur les reins et le foie, voire les testicules. Les poumons sont entièrement recouverts de lésions sévères dont le diamètre peut atteindre 5 cm et qui affectent plus particulièrement les lobes diaphragmatiques.

Les symptômes et les lésions post mortem varient beaucoup selon la race de l'hôte et la souche du capripoxvirus. Les races indigènes sont moins sensibles et ne présentent souvent que quelques lésions mineures qui peuvent être confondues avec des piqûres d'insectes ou de l'ecthyma contagieux. Toutefois, plusieurs types d'animaux contractent souvent une infection à capripox généralisée voire mortelle : les agneaux ne possédant plus d'anticorps maternels, les animaux qui ont été isolés, et les animaux issus de villages isolés et qui ont été transférés dans des régions d'enzootie, et plus particulièrement s'ils ont subi le stress d'un transport à longue distance et ont été mélangés à d'autres ovins ou caprins porteurs d'agents pathogènes. Une importante mortalité touche systématiquement les races importées non-immunisées de moutons et de chèvres, après infection avec un capripoxvirus. L'homme n'est pas sensible aux infections à capripox.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

- **Récolte, envoi et préparation des prélèvements**

Les prélèvements destinés à l'isolement du virus et à la détection de l'antigène doivent être effectués par biopsie ou après la mort, au niveau des papules cutanées, des lésions pulmonaires ou des nœuds lymphatiques. Les échantillons destinés à l'isolement du virus et à l'épreuve de détection d'antigène par une méthode immuno-enzymatique (ELISA) doivent être prélevés au cours de la première semaine d'apparition des signes cliniques, avant l'apparition des anticorps neutralisants. Les échantillons destinés à la détection du génome par réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) pourront être prélevés lorsque les anticorps neutralisants sont présents. Une couche leucocytaire obtenue à partir de sang recueilli sur héparine ou EDTA, et prélevée au cours de la phase virémique (avant la généralisation des lésions ou dans les quatre premiers jours) peut également servir à isoler le virus. Les prélèvements destinés à l'examen histologique doivent inclure des tissus issus de la zone périphérique des lésions, et doivent être placés, immédiatement après leur prélèvement, dans 10 fois leur volume de formol à 10 %.

Les tissus placés dans du formol ne nécessitent aucune précaution de transport particulière. Les échantillons de sang récoltés dans des tubes avec anticoagulant et à partir desquels on obtient la couche leucocytaire servant à isoler le virus, doivent être immédiatement placés sous glace, et traités dans les plus brefs délais. En pratique, les prélèvements de sang peuvent être conservés à 4 °C jusqu'à 2 jours avant d'être traités, mais ils ne doivent être ni congelés ni conservés à température ambiante. Les tissus servant à isoler le virus, à la détection de l'antigène et à la détection du génome doivent être conservés à 4 °C, sous glace, ou à -20 °C. Si les prélèvements doivent être transportés sur une longue distance sans réfrigération, le milieu doit contenir 10 % de glycérol. La taille des prélèvements doit être suffisante pour que le milieu de transport ne puisse pénétrer : c'est la partie centrale de la biopsie qui doit être utilisée pour isoler/détecter le virus.

Les prélèvements destinés à l'examen histologique doivent être préparés selon les techniques de référence et colorés à l'hématoxyline-éosine (H&E). Le matériel prélevé au niveau des lésions et destiné à l'isolement du virus et à la détection de l'antigène est homogénéisé. Pour une telle homogénéisation, une technique est décrite ci-après pour exemple : les tissus sont découpés en petits morceaux à l'aide de ciseaux et de pinces stériles, puis broyés avec un pilon et un mortier, du sable stérile et un volume équivalent de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) stérile 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) et de la néomycine (200 UI/ml). La suspension est congelée-décongelée 3 fois puis un peu clarifiée dans une centrifugeuse de paillasse, à 600 *g* pendant 10 min. Les couches leucocytaires peuvent être obtenues à partir de 5 à 8 ml de sang non-coagulé, par centrifugation à 600 *g* pendant 15 min. On recueille la couche leucocytaire avec soin, puis elle est introduite dans 5 ml d'eau froide bi-distillée, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. On attend 30 s puis on la mélange à 5 ml de milieu de croissance enrichi et froid. Le mélange est centrifugé à 600 *g* pendant 15 min. On élimine le surnageant et le culot cellulaire est mis en

suspension en milieu de culture, par exemple le milieu d'Eagle Glasgow modifié (GMEM). On centrifuge à nouveau à 600 *g* pendant 15 min, puis le culot obtenu est mis en suspension dans 5 ml de GMEM frais. Une autre solution consiste à séparer la couche leucocytaire sur gradient de Ficoll à partir d'un échantillon récolté sur héparine.

a) Culture

La multiplication du capripoxvirus s'effectue en culture tissulaire d'origine ovine, caprine ou bovine, bien que les cultures de première ou seconde explantation de cellules de testicule d'agneau (TA) ou de rein d'agneau (RA) s'avèrent plus sensibles, en particulier celles issues de moutons à laine. La technique suivante est un exemple de procédure : on ensemence soit 1 ml de suspension cellulaire de couche leucocytaire, soit 1 ml de surnageant clarifié d'un prélèvement par biopsie dans des flacons de 25 cm² contenant des cellules TA ou RA confluentes à 90 %. On laisse l'absorption se faire pendant 1 h à 37 °C. La culture est ensuite lavée avec du PBS tiède puis recouverte avec 10 ml d'un milieu approprié, comme du GMEM, contenant des antibiotiques et 2 % de sérum de veau fœtal. Si l'on dispose de tubes de culture cellulaire contenant des cellules TA ou RA et une lamelle couvre-objet, ou de lames porte-objet de culture cellulaire, on les inocule également.

Les flacons doivent être examinés quotidiennement pendant 14 jours, en vue de détecter un effet cytopathogène (ECP), et le milieu doit être remplacé s'il se trouble. Un ECP caractéristique apparaît sur les cellules infectées : la membrane cellulaire se rétracte et se détache des cellules périphériques, les cellules finissent par s'arrondir et la chromatine nucléaire migre en position marginale. Au début, seules de petites zones d'ECP sont visibles, quelquefois dès le quatrième jour après l'infection; 4 ou 6 jours plus tard, ces zones finissent par s'étendre à tout le tapis cellulaire. Si aucun ECP n'est visible après 7 jours, la culture doit être congelée-décongelée 3 fois, puis le surnageant décanté doit être ensemencé sur des cellules TA ou RA fraîches. Aux premiers signes d'ECP dans les flacons, ou avant cela si on utilise un grand nombre de lamelles couvre-objet infectées, on retire une lamelle couvre-objet que l'on fixe à l'acétone et que l'on colore à l'hématoxyline-éosine. La présence de corps d'inclusion intracytoplasmiques éosinophiles est le signe d'une infection par un poxvirus. Leur taille est variable et au plus équivalente à la moitié de celle du noyau. Ils sont entourés d'un halo clair. La formation de syncytiums n'est pas caractéristique d'une infection à capripoxvirus. Il est possible d'empêcher l'ECP ou de le retarder en ajoutant au milieu de culture un sérum spécifique anti-capripoxvirus, ce qui apporte une présomption quant à l'identité de l'agent. Quelques souches de capripoxvirus ont été adaptées à la culture en cellules de rein de singe vervet d'Afrique (VERO), mais elles ne sont pas conseillées pour un premier isolement.

- **Microscopie électronique**

Avant d'être centrifugée, la suspension obtenue lors de la biopsie finale est préparée en vue d'un examen au microscope électronique. Sur une goutte de suspension, reposant sur un parafilm ou sur une plaque de cire, on dépose une grille hexagonale pour microscope électronique à mailles de 400 avec un substrat de carbone pileoforme pré-activé par une décharge lumineuse en vapeurs de pentylamine. La grille est transférée 1 min plus tard dans une goutte de tampon Tris/EDTA, pH 7,8, pendant 20 s, puis dans une goutte d'acide phosphotungstique à 1 %, pH 7,2, pendant 10 s. La grille est égouttée sur papier filtre, séchée à l'air, et placée sous le microscope électronique. Le virion capripox a la forme d'une brique, il est recouvert de petits éléments tubulaires, ses dimensions sont d'environ 290 × 270 nm. Une membrane, provenant de la cellule hôte, peut envelopper quelques-uns des virions : on en examinera donc le plus possible pour vérifier leur aspect (19).

Les virions du capripoxvirus ne peuvent être distingués de ceux de l'orthopoxvirus. Cependant, exception faite du virus de la vaccine, aucun orthopoxvirus n'entraîne de lésions chez les ovins ni chez les caprins. Les virions du parapoxvirus, responsable de l'ecthyma contagieux, sont plus petits, ovales, et couverts d'un élément tubulaire unique et continu, qui donne un aspect strié à chaque virion.

- **Histologie**

La biopsie fixée dans le formol est préparée, colorée à l'hématoxyline-éosine, et montée en coupe. On examine ensuite un grand nombre de coupes au microscope optique. Lors de l'examen histologique, la phase aiguë des lésions cutanées se manifeste surtout par un infiltrat cellulaire massif, une vasculite et un oedème. Les lésions plus précoces se caractérisent par un manchon périvasculaire marqué. Au début, l'infiltration comprend des macrophages, des neutrophiles, et parfois des éosinophiles, puis, lorsque les lésions s'étendent, elle inclut d'avantage de macrophages, de lymphocytes et de plasmocytes. La présence d'un nombre variable de « cellules clavelleuses » dans le derme est un trait caractéristique de toutes les infections par capripoxvirus. Ces cellules clavelleuses peuvent également être présentes dans d'autres organes où des lésions microscopiques de capripoxvirus sont présentes. Il

s'agit de grandes cellules en étoiles comportant des inclusions intracytoplasmiques éosinophiles mal définies et des noyaux vacuolés. La vasculite s'accompagne d'une thrombose et d'un infarctissement qui entraînent un oedème et une nécrose. Les modifications de l'épiderme sont caractérisées par une acanthose, une parakératose, et une hyperkératose. Les autres organes sont modifiés de la même manière, ainsi que par une importante infiltration cellulaire et une vasculite. Les lésions au niveau de l'appareil respiratoire se caractérisent par une ulcération.

- **Inoculation à l'animal**

Une préparation de surnageant décantée obtenue à partir d'une biopsie (voir Section B.1.a Culture), peut aussi être utilisée pour inoculer des agneaux sensibles. Ces agneaux doivent être examinés quotidiennement pour détecter toute réaction cutanée éventuelle.

b) Méthodes immunologiques

- **Épreuves d'immunofluorescence**

On peut également identifier l'antigène du capripoxvirus par immunofluorescence sur des lames couvre-objet ou des lames de culture tissulaire infectées. Elles sont lavées, séchées à l'air, puis elles sont fixées dans l'acétone pendant 10 min. Avec l'épreuve indirecte utilisant des immun-sérums ovins et caprins, on observera un fond très coloré et des réactions non-spécifiques. Toutefois, un conjugué direct peut être préparé à partir des sérums prélevés sur des ovins et des caprins convalescents ou sur des lapins hyperimmunisés avec du capripoxvirus purifié. L'épreuve doit comprendre une culture tissulaire non-inoculée qui servira de témoin négatif car les réactions croisées avec des anticorps dirigés contre les cellules en culture peuvent poser des problèmes. La technique d'immunofluorescence sur section tissulaire peut également être utilisée sur des coupes préparées avec un cryostat.

- **Immunodiffusion en gélose**

Les antigènes précipitants de capripoxvirus ont été mis en évidence par une épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG), mais le fait que le capripoxvirus et le parapoxvirus aient ces antigènes en commun reste un inconvénient. On prépare de l'agarose (1 %) dans un tampon borate, pH 8,6. On la fait fondre par chauffage, puis on dépose 2 ml de la solution obtenue sur une lame porte-objet en verre (76 × 26 mm). Une fois la gélose solidifiée, on creuse des puits en rosette autour d'un puits central. Les puits ont un diamètre de 5 mm, et sont distants de 7 mm (distance entre le centre du puits central et celui des puits périphériques). On remplit les puits de la manière suivante : 3 puits périphériques reçoivent 18 µl de broyat de lésion, en alternance avec les autres puits qui eux reçoivent de l'antigène témoin positif. Le puits central, quant à lui, reçoit 18 µl de sérum témoin positif anti-capripoxvirus. On place les lames dans une chambre humide à température ambiante pendant 48 h. Les lames sont ensuite examinées à l'aide d'une boîte lumineuse pour voir si des lignes de précipitation sont visibles. Si une ligne de précipitation avec le sérum témoin rejoint celle produite par l'antigène témoin positif, le prélèvement testé est considéré comme positif. Cependant, cette épreuve ne permettra pas de différencier une infection à capripox de l'ecthyma contagieux.

Pour la préparation de l'épreuve d'IDG, on utilise 2 flacons de 125 cm³ contenant des cellules TA dont l'un est inoculé avec du capripoxvirus. Le contenu de ce flacon est récolté lorsque l'ECP atteint 90 % (8 à 12 jours). Le flacon est congelé-décongelé 2 fois, puis agité pour en extraire les cellules. Le contenu extrait est ensuite centrifugé à 4 000 *g* pendant 15 min. La majeure partie du surnageant est décantée et conservée, le culot est replacé en suspension dans le surnageant restant. On lyse les cellules à l'aide d'une sonde à ultrasons pendant environ 60 s. Le broyat est alors centrifugé comme précédemment, le surnageant obtenu étant mélangé au surnageant déjà isolé. On ajoute à ce mélange de surnageant un volume équivalent de sulfate d'ammonium saturé, pH 7,4, on abandonne ensuite la solution à 4 °C. Au bout de 1 h, la solution est centrifugée à 4 000 *g* pendant 15 min, le précipité est recueilli puis replacé en suspension dans une solution saline à 0,8 %. La solution obtenue sera utilisée pour l'épreuve d'IDG. Le flacon non-inoculé est traité exactement de la même façon et constituera l'antigène témoin de la culture tissulaire (17).

- **Épreuve immuno-enzymatique**

Après clonage de la protéine de structure P32 de capripoxvirus fortement antigénique, il est possible de produire des réactifs diagnostiques à partir de l'antigène recombinant exprimé, qu'il s'agisse d'obtenir de l'antisérum polyclonal monospécifique P32 ou des anticorps monoclonaux. Ces réactifs ont facilité l'élaboration d'un ELISA de haute spécificité (5). À l'aide d'antisérum hyperimmun de lapin, obtenu par inoculation du capripoxvirus purifié à des lapins, il est possible de piéger, sur une plaque ELISA, l'antigène capripox à partir d'une biopsie ou du surnageant d'une culture tissulaire. La présence de l'antigène peut être mise en évidence à l'aide de sérum de cobaye dirigé contre la protéine de structure P32 spécifique du groupe, de peroxydase de raifort conjuguée à de l'immunoglobuline de lapin anti-cobaye, et d'une solution chromogène/substrat.

c) Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques

Il est impossible de distinguer les différentes souches de capripoxvirus bovins, ovins, caprins par les méthodes sérologiques. En revanche, les souches peuvent être identifiées si l'on compare les fragments de génome obtenus après digestion de leur ADN purifié par l'enzyme *Hind* III, (2, 16). Grâce à cette technique et au séquençage du génome, des différences ont été observées entre les isolats de plusieurs espèces (12), mais les résultats obtenus ne sont pas toujours les mêmes, ce qui prouve l'existence d'une circulation des souches virales entre les espèces et de recombinaisons entre souches de virus sauvage (10).

La PCR peut être utilisée pour détecter le génome de capripoxvirus dans des échantillons de biopsies ou de cultures cellulaires. Les amorces pour le gène codant la protéine virale d'attachement et le gène codant la protéine virale de fusion sont spécifiques des capripoxvirus, et la nature des produits de PCR peut être confirmée en utilisant les sites de reconnaissance des enzymes de restriction (11, 13).

2. Épreuves sérologiques

a) Séroneutralisation virale

Un sérum à tester est soit titré à l'aide d'un capripoxvirus à titre constant (100 DICT₅₀ [dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire]), soit une souche virale de référence est titrée à l'aide d'une dilution constante de sérum à tester de façon à déterminer un index de neutralisation. Du fait de la sensibilité variable de la culture tissulaire vis-à-vis du capripoxvirus et donc de la difficulté de garantir les 100 DICT₅₀, l'index de neutralisation reste la méthode préférée. Ce test utilise des plaques de microtitrage pour culture tissulaire comportant 96 puits à fond plat. Il peut également être effectué dans des tubes de culture tissulaire avec les changements appropriés de volumes utilisés, bien que la lecture soit plus difficile dans les tubes. Les résultats obtenus par séroneutralisation virale avec les cellules VERO se sont avérés plus fiables (20).

• Protocole

- i) Les sérums à tester, y compris un témoin positif et un témoin négatif, sont dilués au 1/5^e en milieu de Eagle/HEPES (hydroxyéthylpiperazine-2-N, acide éthanesulfonique -2-N), puis inactivés à 56 °C pendant 30 min.
- ii) On introduit ensuite 50 µl du premier sérum inactivé dans les puits des colonnes 1 et 2, rangs A à H de la microplaque. On place le deuxième sérum dans les colonnes 3 et 4, le troisième dans les colonnes 5 et 6, le sérum témoin positif dans les colonnes 7 et 8 et le sérum témoin négatif dans les colonnes 9 et 10. Les colonnes 11 et 12 ainsi que tous les puits du rang H, contiennent 50 µl de milieu Eagle/HEPES sans sérum.
- iii) Dans des tubes à vis, on dilue une souche de référence de capripoxvirus (il s'agit habituellement d'une souche de vaccin connue pour sa capacité à bien se multiplier en culture tissulaire), avec un titre supérieur à 6 DICT₅₀ par ml (exprimé en log₁₀), de façon à disposer d'une série de dilutions de 5,0 ; 4,0 ; 3,5 ; 3,0 ; 2,5 ; 2,0 et 1,5 DICT₅₀ par ml (ce qui équivaut à 3,7 ; 2,7 ; 2,2 ; 1,7 ; 1,2 ; 0,7 et 0,2 DICT₅₀ pour 50 µl).
- iv) En commençant par le rang G et la plus diluée des préparations virales, on ajoute 50 µl de virus dans chacun des puits du rang. On fait de même pour chaque dilution virale, le rang A comportant la dilution virale ayant le titre le plus élevé.
- v) Les microplaques sont couvertes et incubées à 37 °C pendant 1 h.
- vi) On prépare les cellules TA provenant de monocouches précultivées, sous forme de suspension de 10⁵ cellules/ml dans du milieu de Eagle contenant des antibiotiques et 2 % de sérum de veau foetal. Après avoir incubé les microplaques, on ajoute 100 µl de suspension cellulaire dans tous les puits, exception faite des puits H11 et H12, qui jouent le rôle de puits témoins pour le milieu. Les autres puits du rang H jouent le rôle de témoins cellules et de témoins sérum.
- vii) Les microplaques sont couvertes et incubées à 37 °C pendant 9 jours.
- viii) A l'aide d'un microscope inversé, on procède à un examen quotidien des monocouches à partir du 4^{ème} jour pour détecter un éventuel ECP. Aucun ECP ne doit apparaître dans les cellules du rang H. Si on a utilisé la souche de vaccin 0240 KSGP du capripoxvirus, on procède à la lecture finale le 9^{ème} jour. Le titre de chaque paire de dilution virale est déterminé par la méthode de Kärber (14). Si l'on attend plus longtemps, le virus réalise inmanquablement une « percée », le virus neutralisé au préalable finissant par se dissocier de l'anticorps.
- ix) *Interprétation des résultats* : l'index de neutralisation est la différence exprimée en log₁₀ entre le titre du virus dans le sérum négatif et dans le sérum à éprouver. L'épreuve est positive si l'index

est $\geq 1,5$. L'épreuve peut être rendue plus sensible lorsque le sérum d'un même animal est examiné avant et après l'infection. L'immunité vis-à-vis de l'infection à capripox est principalement à médiation cellulaire. L'obtention d'un résultat négatif, notamment à la suite d'une vaccination où la réaction est nécessairement faible, ne signifie donc pas obligatoirement que l'animal dont on a prélevé le sérum n'est pas protégé contre le virus.

Il existe une méthode à virus constant et sérum variable. Elle emploie plusieurs dilutions de sérum de 1/5 à 1/500 et sur des cellules musculaires de veau foetal. Cette méthode permet d'éviter le problème posé par la « percée » du virus, car ces cellules sont moins sensibles au capripoxvirus que les cellules TA.

b) Immunodiffusion en gélose

L'épreuve d'IDG ne peut être recommandée en tant qu'épreuve sérologique pour le diagnostic de l'infection à capripox, du fait des réactions croisées existant avec l'anticorps de l'ecthyma contagieux, dont le diagnostic différentiel est le plus important. Ces réactions entraînent de faux résultats positifs.

c) Épreuve d'immunofluorescence indirecte

L'épreuve d'immunofluorescence indirecte s'effectue en culture tissulaire infectée par le capripoxvirus, soit sur des lamelles couvre-objet, soit sur lame porte-objet. Cette épreuve met également en jeu une culture tissulaire témoin non-infectée, et des sérums témoins positifs et négatifs. La culture infectée et la culture témoin sont fixées dans de l'acétone à -20°C pendant 10 min puis conservées à 4°C . On effectue des dilutions de sérums à analyser dans du PBS, avec une première dilution de 1/5. Les dilutions positives sont identifiées à l'aide d'une gamma globuline anti-bovin conjuguée à de l'isothiocyanate de fluorescéine (8). Des réactions croisées peuvent survenir avec l'ecthyma contagieux, la stomatite papuleuse bovine et probablement d'autres infections à poxvirus.

d) Analyse par Western blot

L'analyse par Western blot d'un sérum contre un lysat cellulaire infecté par le capripoxvirus constitue un moyen sensible et spécifique de déceler la présence d'anticorps contre les protéines de structure du capripoxvirus, même si cette épreuve reste coûteuse et difficile à mettre en œuvre (7).

Les cellules TA infectées par le capripoxvirus doivent être récoltées lorsque l'ECP atteint 90 %. Elles sont ensuite congelées-décongelées 3 fois, les débris cellulaires sont centrifugés et se rassemblent en culot. Le surnageant est décanté et les protéines sont alors séparées par SDS-PAGE (électrophorèse en gel de dodécyl sulfate de sodium-polyacrylamide). On recommande l'utilisation d'un système vertical et discontinu de gel, comprenant un gel concentrant, contenant de l'acrylamide (5 %) dans du Tris (125 mM), pH 6,8, et du SDS (0,1 %), ainsi qu'un gel de résolution contenant de l'acrylamide (10 à 12,5 %) dans du tampon Tris (560 mM), pH 8,7 et du SDS (0,1 %), ce gel est associé à un tampon de migration contenant du tampon Tris (250 mM), de la glycine (2 M) et du SDS (0,1 %). Avant leur utilisation, les échantillons de surnageant doivent être préparés : on les fait bouillir pendant 5 min avec un tampon de lyse approprié. Il est possible de substituer à l'antigène obtenu sur culture tissulaire un virus purifié ou des antigènes P32 recombinants (6, 11).

Des marqueurs de poids moléculaire doivent être testés en parallèle avec les échantillons de protéines. Les protéines séparées dans le gel SDS-PAGE doivent être transférées par électroblot sur une membrane de nitrocellulose (MNC). A la suite de ce transfert, on rince soigneusement la MNC dans du PBS et on la bloque dans 3 % d'albumine de sérum bovin (ASB) dans du PBS, ou dans 5 % de lait écrémé en poudre dans du PBS, sur un agitateur rotatif, à 4°C , pendant une nuit. On peut procéder de deux manières : soit on découpe des bandes de MNC à l'aide d'un appareil spécial et on effectue simultanément des épreuves avec plusieurs échantillons, soit on découpe les bandes qui peuvent être incubées chacune séparément. La MNC est lavée minutieusement 5 fois en renouvelant le PBS à chaque fois, pendant 5 min, sur un agitateur rotatif. Elle est ensuite incubée à température ambiante, toujours sur l'agitateur, pendant 1 h et demi, avec le sérum approprié à une dilution de 1/50 dans du tampon bloquant (3 % d'ASB, 0,05 % de Tween 20 dans du PBS ; ou 5 % de lait en poudre et 0,05 % de Tween 20 dans du PBS). La membrane est à nouveau lavée soigneusement puis replacée en incubation (dans du tampon bloquant), cette fois avec des immoglobulines conjuguées à une immunoglobuline anti-espèce marquée à la peroxydase de raifort, à une dilution déterminée par titrage. Après une incubation supplémentaire à température ambiante pendant 1 h 1/2, on lave la membrane et on ajoute une solution de tétrahydrochlorure de diaminobenzidine (10 mg dans 50 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, et 20 μl d'eau oxygénée à 30 % [v/v]). Le tout est incubé à température ambiante entre 3 et 7 min, sur un agitateur. La membrane est observée en permanence. On arrête la réaction par un lavage avec du PBS, avant que la couleur de fond ne devienne trop intense. Il convient d'utiliser des sérums témoins négatif et positif à chaque étape de la réaction.

Les prélèvements testés qui sont positifs et les témoins positifs donneront des protidogrammes correspondant aux réactions obtenues avec des protéines ayant pour masse moléculaire : 67, 32, 26, 19

et 17 kDa, c'est à dire les principales protéines de structure du capripoxvirus. Les prélèvements testés qui sont négatifs donneront d'autres profils de protidogrammes. Un sérum hyperimmun contre le parapoxvirus (stomatite papuleuse bovine) réagira avec certaines des protéines de capripoxvirus, mais pas avec la protéine ayant une masse moléculaire de 32 kDa, spécifique du capripoxvirus.

e) Méthode immuno-enzymatique

Un ELISA pour capripoxvirus a été développé à partir d'une expression de la protéine de structure P32 du capripoxvirus et d'anticorps monoclonaux dirigés contre cette protéine (6, 11).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Des vaccins à capripoxvirus vivant atténué et à capripoxvirus inactivé ont été utilisés pour protéger les ovins et les caprins contre l'infection à capripox (voir références 4 et 15). Jusqu'à présent, toutes les souches de capripoxvirus étudiées, qu'elles soient d'origine ovine, caprine ou bovine, ont en commun un site de neutralisation majeur. L'infection par une souche de virus protège donc l'animal contre les autres souches de capripoxvirus (3). C'est pourquoi il est possible d'utiliser une seule souche de capripoxvirus pour protéger à la fois les ovins et les caprins contre toutes les souches sauvages du virus, qu'elles soient d'origine africaine ou asiatique (18, 20).

Il existe deux formes antigéniques du capripoxvirus, le virion intact recouvert de petits éléments tubulaires, et le virion intact qui est recouvert, en plus, par une membrane issue de la cellule hôte. Cette dernière forme est généralement élaborée par les animaux infectés, alors que l'autre est produite en cultures tissulaires infectées congelées puis décongelées. Les virus-vaccins tués obtenus en culture cellulaire sont des virions pratiquement nus, qui, lorsqu'ils sont utilisés comme vaccin, ne provoquent pas de réaction immunitaire contre le virion lié à la membrane cellulaire. Ceci explique en partie le peu de réussite obtenue avec des vaccins à virus inactivé. D'autre part, les virus-vaccin inactivés stimulent moins la réaction immunitaire à médiation cellulaire qu'une répllication de virus-vaccins vivants alors que cette réaction est celle qui protège le mieux contre une infection par poxvirus. De nombreuses souches de capripoxvirus ont été largement utilisées pour produire des vaccins à virus vivant (9), par exemple : la souche 0240 de la variole ovine-caprine du Kenya, les souches roumaine et RM-65 utilisées principalement chez les ovins et les souches de Mysore et de Gorgan utilisées chez les caprins. Une vaccination avec la souche 0240 protège les ovins et les caprins contre l'infection à capripox pendant plus d'un an, et vraisemblablement de façon définitive contre une épreuve virulente mortelle. La souche 0240 ne doit pas être utilisée chez les taurins.

Une nouvelle génération de vaccins à virus capripox est en cours d'élaboration. Elle utilise le génome du capripoxvirus en tant que vecteur d'autres agents pathogènes des ruminants, par exemple les gènes du virus de la peste bovine ou ceux de la peste des petits ruminants (PPR). Une vaccination avec le vaccin recombinant assure donc à l'animal une protection à la fois contre l'infection à capripox, la peste bovine et la PPR (1).

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Des précisions sur l'origine, les passages en culture tissulaire ou sur animal doivent être fournies avec toute souche de capripoxvirus utilisée pour la production du vaccin. L'emploi de cette souche ne doit présenter de danger pour aucune race d'ovins et de caprins auxquelles le vaccin est destiné, y compris les femelles gravides. D'autres conditions sont nécessaires : le virus ne doit pas être transmissible, il doit rester atténué après un passage supplémentaire en culture tissulaire, et assurer à l'animal une protection totale d'un an au moins, après une épreuve virulente effectuée à l'aide d'une souche de virus sauvage. Il convient de préparer suffisamment de virus-vaccin, et de le conserver afin de pouvoir disposer d'une semence de travail fiable pour la production régulière de vaccin.

b) Méthodes de culture

La semence de vaccin doit être lyophilisée et conservée à -20°C , dans des ampoules de 2 ml. Lorsqu'elle est liquide, des températures inférieures ou égales à -70°C lui assurent une meilleure stabilité. Pour obtenir un rendement maximum, le virus doit être cultivé sur des cellules de première ou seconde explantation de TA provenant de moutons à laine. Les cellules Vero peuvent également être utilisées.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Les lots de semence doivent répondre aux critères suivants :

- i) **Pureté** : ils ne doivent comporter aucun autre virus, en particulier de pestivirus, comme celui de la pestivirose ovine (*border disease*) ou celui de la maladie des muqueuses (*bovine viral diarrhoea*), ni aucune contamination par des bactéries, des champignons et/ou des mycoplasmes.
- ii) **Innocuité** : le vaccin ne doit entraîner aucune réaction clinique quand il est injecté à des ovins et à des caprins, toutes races confondues, par la voie d'administration recommandée.
- iii) **Efficacité** : le vaccin doit procurer une immunité totale vis-à-vis de l'infection à capripox, chez toutes les races d'ovins et de caprins, pendant un an au moins.

Les tests exigés sont décrits dans la Section C.4.

2. Méthode de fabrication

La production des lots de vaccin s'effectue sur des cultures de cellules de seconde explantation de TA ou des cultures de cellules de première explantation de RA en monocouches fraîches. On lave la monocouche de cellules TA ou RA avec du PBS tiède, puis on lui inocule le contenu d'une ampoule de virus préalablement reconstituée avec du GMEM. On laisse la monocouche absorber le virus pendant 15 min à 37 °C, puis on la recouvre avec du GMEM. Dans un délai de 4 à 6 jours, l'ECP se sera bien étendu (50 à 70 %). On devra rechercher alors dans la culture la présence d'ECP non-spécifique, une turbidité du milieu ou une variation du pH du milieu. La culture est congelée-décongelée 3 fois, puis on retire la suspension et on la centrifuge à 600 *g* pendant 20 min. Un second passage peut s'avérer nécessaire pour produire le vaccin en quantité suffisante en vue d'un lot de production (il faut 5 flacons de 175 cm² pour obtenir 10⁶ doses).

On répète la procédure et on mélange séparément la récolte provenant de chaque flacon numéroté, avec un volume équivalent réfrigéré du mélange constitué de 5 % d'hydrosylat de lactalbumine et de 10 % de saccharose. On transfère ensuite les contenus de ces flacons dans des ballons que l'on maintient à –20 °C. Avant de stocker le virus, on prélève 0,2 ml dans chaque ballon pour effectuer des tests de stérilité. On prélève des échantillons de 0,2 ml supplémentaires dans 10 ballons et on les mélange de façon à obtenir un volume de 2 ml avec lequel on effectuera un titrage du virus. Toutes les manipulations concernant les lots de vaccin doivent être consignées par écrit.

Les vaccins à virus inactivé sont généralement produits à partir de souches de capripoxvirus sauvages non-atténuées, qui sont multipliées en culture tissulaire comme cela a été décrit précédemment, inactivées avec 0,03 % de formol, puis mélangées à un volume équivalent de gel d'alumine jouant le rôle d'adjuvant. Le formol n'est désormais plus considéré comme un adjuvant approprié pour d'autres vaccins viraux, car son mode d'action ne garantit pas l'inactivation complète et efficace de tous les virus vivants. Ceci n'a pas été étudié avec précision dans le cas des capripoxvirus.

3. Contrôles en cours de fabrication

Cellules : les cellules doivent provenir des testicules ou des reins d'un jeune agneau en bonne santé issu d'un troupeau de moutons à laine indemne de tremblante. On surveillera l'apparition d'ECP et la morphologie des cellules (qui sont à prédominance fibroblastique) durant toute la culture. Généralement, on réussit à effectuer jusqu'à 10 passages. Pour la production du vaccin, il convient d'entretenir parallèlement des cultures témoins non-infectées qui subiront un passage supplémentaire pour examen ultérieur. Les techniques d'immunofluorescence et d'immunoperoxidase permettent de rechercher la présence de souches virales dépourvues d'effet cytopathogène de maladie des muqueuses ou de pestivirose ovine. Il convient si possible de préparer et d'observer les cellules avant de produire le vaccin. Un stock de cellules doit être conservé dans du DMSO (sulphoxide diméthyle) stérile, en azote liquide (aliquots de 1 ou 2 ml contenant 20 × 10⁶ cellules par ml). Le sérum utilisé dans le milieu de culture ne doit contenir aucun anticorps vis-à-vis du capripoxvirus et ne doit pas être contaminé par un pestivirus.

Virus : le virus de semence et le vaccin final doivent être titrés dans des tubes de culture cellulaire ou sur microplaques. Il est impératif de rechercher, dans les échantillons de vaccin, la présence de virus contaminants, y compris de souches de pestivirus entraînant ou non un effet cytopathogène. Ces échantillons doivent être mélangés à un sérum anti-capripoxvirus, possédant un titre élevé, et qui s'est avéré dépourvu d'anticorps contre les pestivirus. Cela évitera toute interférence avec le virus vaccin lui-même lors du test. Le vaccin stock peut être conservé à –20 °C jusqu'à ce que les tests de stérilité et le titrage aient été effectués, tests après lesquels il doit être lyophilisé dans des ampoules par aliquots de 1 ml contenant 100 doses. La récolte de virus-vaccin diluée en hydrosylat de lactalbumine et de saccharose doit avoir un titre minimum, après lyophilisation, de 4,5 DICT₅₀ par ml ce qui équivaut à une dose vaccinale de 2,5 DICT₅₀. On effectue un titrage supplémentaire sur 5 ampoules de préparation lyophilisée choisies de façon aléatoire, afin de confirmer la valeur du titre.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Pour les tests de stérilité et de non-contamination du matériel biologique, se reporter au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

On place 4 moutons et 4 chèvres dont on connaît la sensibilité à l'infection à capripox dans des animaleries ayant un niveau de confinement élevé, et on prélève leur sérum. On reconstitue 5 ampoules de vaccin lyophilisé choisies de façon aléatoire dans du PBS stérile, puis on les mélange. On inocule à un mouton et à une chèvre 0,2 ml de vaccin concentré, par voie intradermique. On dilue 20 fois le vaccin restant dans du PBS stérile, puis on inocule à 2 moutons et à 2 chèvres la dose vaccinale recommandée, à savoir 0,2 ml, par voie sous-cutanée. Les moutons et les chèvres restants serviront de témoins. On procède à l'examen clinique des animaux quotidiennement, et on relève leur température rectale. Au 21^e jour après la vaccination, on prélève à nouveau du sérum sur les 8 animaux, puis on les éprouve en leur inoculant une souche virulente de capripoxvirus par voie intradermique. On suit la réaction clinique au cours des 14 jours suivants. Tandis que les animaux témoins doivent développer les signes classiques de l'infection à capripox, les animaux vaccinés ne doivent présenter aucune réaction locale ou systémique autre qu'une réaction d'hypersensibilité retardée, qui disparaîtra en 4 jours. On procède à des prélèvements supplémentaires de sérum au 30^e jour après la vaccination. Dans les prélèvements du 21^e jour on recherche les anticorps vis-à-vis de quelques maladies virales susceptibles d'avoir contaminé le vaccin. On compare les prélèvements datant du jour de la vaccination et ceux du 30^e jour afin de s'assurer de l'absence d'anticorps vis-à-vis d'un pestivirus.

On contrôle également le vaccin reconstitué, sur des souris et des cobayes. On inocule 0,5 ml de vaccin dans la patte arrière de 2 cobayes, par voie intramusculaire, ainsi que des doses respectives de 0,5 ml et 0,1 ml à 2 cobayes et 6 souris, cette fois par voie intrapéritonéale. Deux cobayes et 4 souris non-inoculés serviront de témoins. Après 3 semaines d'observation, les animaux sont euthanasiés, et autopsiés. Ils ne doivent présenter aucune lésion imputable au vaccin.

c) Activité

Moins de 1 DICT₅₀ de la souche 0240 suffit pour protéger les ovins et les caprins. Toutefois, il est nécessaire d'effectuer des tests d'activité lorsqu'on ignore la dose immunisante minimum. Pour cela, on compare le titre d'une souche d'épreuve virulente inoculée sur les flancs d'animaux vaccinés et d'animaux témoins. Après vaccination, on rase le flanc d'au moins 3 animaux vaccinés et 3 animaux témoins. On prépare des dilutions log₁₀ de virus d'épreuve dans du PBS stérile, puis on injecte six de ces dilutions (0,1 ml par inoculum) par voie intradermique réparties sur toute la longueur du flanc de l'animal. On injecte 4 aliquots de chaque dilution dans la partie basse du flanc. Chez les animaux témoins, un oedème peut se développer au niveau des 24 sites d'injection. En revanche, les 4 sites concernés par les inoculums les plus dilués présentent peu ou pas de réaction. Les animaux vaccinés présentent, quant à eux, une réaction d'hypersensibilité passagère au niveau des sites d'injection lors des premières 24 h. Celle-ci doit rapidement régresser. Des zones discrètes de nécrose peuvent apparaître au niveau des sites d'injection où le virus d'épreuve est le plus concentré. La taille des macules/papules est mesurée entre 8 et 10 jours après l'épreuve. On calcule le titre du virus d'épreuve sur les animaux vaccinés et les animaux témoins. La protection est suffisante lorsque la différence de log titre est >log₁₀ 2,5.

d) Durée de l'immunité

A la suite d'une vaccination des ovins et des caprins avec la souche 0240, l'immunité vis-à-vis du virus virulent dépasse un an et l'animal reste protégé contre une infection généralisée causée par une inoculation intradermique pendant 3 ans au moins, mais on constate qu'en réalité cette protection demeure le plus souvent à vie. La durée de l'immunité procurée par d'autres souches de vaccin doit être confirmée sur des ovins et des caprins, par des épreuves effectuées dans un milieu où aucune souche de terrain de capripoxvirus n'est susceptible de fausser les résultats.

Les vaccins à virus inactivé protègent moins d'un an. Pour les raisons précédemment citées au début de cette section, ils ne protègent pas l'animal contre la forme de capripoxvirus généralement associée à une transmission naturelle.

e) Stabilité

Les préparations de vaccin contre l'infection à capripox convenablement lyophilisées, et plus particulièrement celles comportant un agent protecteur (saccharose et hydrolysate de lactalbumine), restent stables plus de 25 ans si elles sont conservées à -20 °C, et entre 2 et 4 ans à 4 °C. Il a été démontré que ces préparations restent stables à des températures plus élevées, mais aucun contrôle à long terme n'a encore été rapporté.

Les vaccins inactivés doivent être conservés à 4 °C, leur délai de péremption est généralement de 1 an.

f) Agents de conservation

Aucun produit de conservation autre qu'un agent protecteur comme le saccharose et l'hydrolysate de lactalbumine, n'est nécessaire pour les préparations lyophilisées.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Il n'existe aucune précaution à prendre autre que celles décrites précédemment ayant trait à la stérilité et à la présence éventuelle d'agents contaminants. Les vaccins obtenus à partir de la souche 0240 ne doivent pas être utilisés chez les taurins (*Bos taurus*).

L'homme ne peut être infecté par un capripoxvirus.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Des tests d'innocuité doivent être effectués sur le produit final de chaque lot, comme cela est décrit dans la Section C.4.b.

b) Activité

Une fois que l'activité d'une souche utilisée pour la production du vaccin a été déterminée en termes de dose immunisante minimum, il n'est pas nécessaire de la déterminer à nouveau pour chaque lot de produit final à condition que le titre de virus qu'il contient ait été vérifié.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. 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.
2. BLACK D.N., HAMMOND J.M. & KITCHING R.P. (1986). Genomic relationship between capripoxviruses. *Virus Res.*, **5**, 277–292.
3. CAPSTICK P.B. (1961). Annual Report. Kenya Veterinary Department, Kenya, 45–47.
4. CARN V.M. (1993). Control of capripoxvirus infections. *Vaccine*, **11**, 1275–1279.
5. CARN V.M. (1995). An antigen trapping ELISA for the detection of capripoxvirus in tissue culture supernatant and biopsy samples. *J. Virol. Methods*, **51**, 95–102.
6. CARN V.M., KITCHING R.P., HAMMOND J.M., CHAND P., ANDERSON J. & BLACK D.N. (1994). Use of a recombinant antigen in an indirect ELISA for detecting bovine antibody to capripoxvirus. *J. Virol. Methods*, **49**, 285–294.
7. CHAND P., KITCHING R.P. & BLACK D.N. (1994). Western blot analysis of virus-specific antibody responses to capripoxvirus and contagious pustular dermatitis infections in sheep. *Epidemiol. Infect.*, **113**, 377–385.
8. DAVIES F.G. & ATEMA C. (1978). The antibody response in sheep infected with a Kenyan sheep and goat pox virus. *J. Comp. Pathol.*, **88**, 205–210.
9. DAVIES F.G. & MBUGWA G. (1985). The alterations in pathogenicity and immunogenicity of a Kenya sheep and goat pox virus on serial passage in bovine foetal muscle cell cultures. *J. Comp. Pathol.*, **95**, 565–576.
10. GERSHON P.D., KITCHING R.P., HAMMOND J.M. & BLACK D.N. (1989). Poxvirus genetic recombination during natural virus transmission. *J. Gen. Virol.*, **70**, 485–489.
11. HEINE H.G., STEVENS M.P., FOORD A.J. & BOYLE D.B. (1999). A capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia virus H3L gene. *J. Immunol. Methods*, **227**, 187–196.

12. HOSAMANI M., MONDAL B., TEMBHURNE P.A., BANDYOPADHYAY S.K., SINGH R.K. & RASOOL T.J. (2004). Differentiation of sheep pox and goat poxviruses by sequence analysis and PCR-RFLP of P32 gene. *Virus Genes*, **29**, 73–80.
13. IRELAND D.C. & BINEPAL Y.S. (1998). Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J. Virol. Methods*, **74**, 1–7.
14. KÄRBER G. (1931). Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Archive für Experimentelle Pathologie Pharmacologie*, **162**, 480–483.
15. KITCHING R.P. (1983). Progress towards sheep and goat pox vaccines. *Vaccine*, **1**, 4–9.
16. KITCHING R.P., BHAT P.P. & BLACK D.N. (1989). The characterization of African strains of capripoxvirus. *Epidemiol. Infect.*, **102**, 335–343.
17. KITCHING R.P., HAMMOND J.M. & BLACK D.N. (1986). Studies on the major precipitating antigen of capripoxvirus. *J. Gen. Virol.*, **67**, 139–148.
18. KITCHING R.P., HAMMOND J.M. & TAYLOR W.P. (1986). A single vaccine for the control of capripox infection in sheep and goats. *Res. Vet. Sci.*, **42**, 53–60.
19. KITCHING R.P. & SMALE C. (1986). Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Res. Vet. Sci.*, **41**, 425–427.
20. KITCHING R.P. & TAYLOR W.P. (1985). Clinical and antigenic relationship between isolates of sheep and goat pox viruses. *Trop. Anim. Health Prod.*, **17**, 64–74.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de références de l'OIE pour la Clavelée et Variole caprine (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 2.8.

SUIDÉS

CHAPITRE 2.8.1.

PESTE PORCINE AFRICAINE

RÉSUMÉ

La peste porcine africaine (PPA) est une maladie infectieuse des suidés domestiques et sauvages ; elle est due à un virus responsable de divers syndromes. La maladie aiguë est caractérisée par une forte fièvre, des hémorragies du système réticulo-endothélial et un taux de mortalité élevé. Il a été démontré que les tiques du genre Ornithodoros, en particulier O. moubata et O. erraticus, sont à la fois réservoirs et vecteurs du virus de la PPA.

Le virus de la PPA est le seul membre de la famille des Asfarviridae, genre Asfivirus.

Les méthodes de diagnostic de laboratoire se répartissent en deux groupes : le premier rassemble les épreuves d'isolement et de recherche des antigènes viraux ainsi que de l'ADN génomique, le second, ceux de la mise en évidence des anticorps. Le choix des épreuves à employer dépend de la situation épidémiologique et des capacités de diagnostic des laboratoires de la région ou du pays.

Identification de l'agent pathogène : *le diagnostic de laboratoire doit viser l'isolement du virus en réalisant simultanément, l'inoculation de cultures de leucocytes ou de moelle osseuse de porc, la détection de l'antigène sur des frottis ou des coupes de tissus au cryostat à l'aide d'une épreuve des anticorps fluorescents (EAF) et, si possible, la détection de l'ADN génomique par une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR). La PCR est une excellente technique, rapide et très sensible pour la détection du virus de la PPA. Elle est très utile dans de nombreuses circonstances. Elle est particulièrement intéressante quand les tissus ne permettent pas l'isolement du virus et la détection de l'antigène.*

Dans les cas douteux, les prélèvements seront passés sur leucocytes et les techniques décrites ci-dessus seront renouvelées.

Épreuves sérologiques : *les porcs qui survivent à l'infection naturelle développent en général des anticorps dirigés contre le virus de la PPA à partir du 7^e ou 10^e jour après l'infection ; ces anticorps peuvent persister pour de longues périodes. Là où la maladie est enzootique, là où un premier foyer est dû à une souche de basse virulence, la recherche des nouveaux foyers doit inclure la mise en évidence par une méthode immuno-enzymatique (ELISA), des anticorps spécifiques, dans le sérum ou les extraits de tissus prélevés. Diverses techniques telles que l'immunofluorescence indirecte (IFI), les réactions immuno-enzymatique (ELISA) et l'immuno-empreinte sont disponibles pour la recherche des anticorps.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *À l'heure actuelle il n'existe pas de vaccin pour la PPA.*

A. INTRODUCTION

Le virus de la PPA est un virus complexe à ADN enveloppé à symétrie icosaédrique qui présente des propriétés communes aux Iridovirus et aux Poxvirus (4, 28). Le virus est actuellement classé comme le seul membre de la

famille des *Asfarviridae*. Au moins 28 protéines structurales ont été identifiées dans les particules virales intra-cellulaires (200 nm) (26). Plus d'une centaine de protéines infectieuses ont aussi été identifiées dans les macrophages des porcs infectés et au moins 50 d'entre elles réagissent avec les sérums de porcs infectés ou guéris. Le génome du virus comprend entre 170 et 192 kilobases (kb), dont la partie centrale de 125 kb est conservée et les régions terminales sont variables. Ces régions variables codent 5 familles multigéniques qui sont directement impliquées dans la variabilité du génome viral (7). L'analyse de la séquence complète de diverses souches du virus de la PPA a été réalisée. Les souches du virus sont variables quant à leur pouvoir de provoquer la maladie, mais jusqu'à présent un seul sérotype a été reconnu par les tests sérologiques.

L'épidémiologie moléculaire de la maladie est étudiée grâce, d'abord au séquençage partiel du gène VP72 qui différencie jusqu'à 22 génotypes distincts (9, 16), puis par l'analyse des régions variables situées dans la partie centrale conservée du génome viral qui permet une résolution intra-génotypique des relations entre virus (18, 23).

Les virus PPA provoquent divers syndromes allant de formes suraiguë ou aiguë à une forme chronique de la maladie avec des porteurs en bonne santé apparente. Le porc est le seul animal domestique naturellement infecté par le virus de la PPA. Le sanglier européen et les porcs semi-sauvages en divagation sont aussi sensibles et présentent des signes cliniques et des taux de mortalité semblables à ceux observés chez les porcs domestiques. En revanche, le phacochère (*Phacochoerus aethiopicus*), le potamochère (*Potamochoerus porcus*) l'hylochère (*Hylochoerus meinertzhageni*) sont résistants au virus et ne présentent pas ou peu de signes cliniques. Ces espèces de suidés sauvages jouent en Afrique le rôle de réservoirs du virus de la PPA (26).

L'incubation est en général de 3 à 15 jours. Les souches les plus virulentes sont responsables d'une maladie hémorragique d'évolution suraiguë ou aiguë, se traduisant par une fièvre élevée, une perte de l'appétit, des hémorragies de la peau et des organes internes, la mort survenant en 3 à 10 jours, parfois même avant que les premiers symptômes soient observés. Le taux de mortalité peut atteindre 100 %. Les souches moins virulentes entraînent des signes cliniques plus discrets – légère fièvre, diminution de l'appétit et abattement – qui peuvent être volontiers confondus avec d'autres affections du porc et qui peuvent ne pas conduire à une suspicion de PPA. Dans certains pays, des souches avirulentes, non hémadsorbantes, provoquent parfois une infection asymptomatique non hémorragique, mais une séroconversion ; cependant certains sujets peuvent développer de petites lésions du poumon et de la peau dans les zones de protrusions osseuses et dans celles soumises à des traumatismes. Les animaux guéris qui ont survécu à une forme aiguë ou une forme chronique peuvent rester infectés de façon persistante et devenir des porteurs de virus. Les bases biologiques de la persistance du virus de la PPA ne sont toujours pas éclaircies (10). Les porcs guéris porteurs de virus et les suidés sauvages infectés persistants constituent le problème le plus important lors du contrôle de la maladie. Le dépistage sérologique des porteurs chroniques du virus s'est révélé essentiel pour le succès des programmes d'éradication (5).

La PPA ne peut être différenciée de la peste porcine classique (PPC) ni par l'observation clinique ni par l'examen nécropsique, et les deux maladies doivent être incluses dans le diagnostic différentiel des syndromes fébriles hémorragiques du porc. Des septicémies bactériennes peuvent aussi être confondues avec la PPA et PPC. Les examens de laboratoire sont essentiels pour distinguer ces deux maladies.

Dans les pays indemnes de PPA mais suspectant sa présence, le diagnostic de laboratoire doit viser l'isolement du virus par mise en œuvre simultanée, de l'inoculation de cultures de leucocytes ou de moelle osseuse de porc, d'une recherche antigénique sur frottis ou coupes de tissus au cryostat par immunofluorescence (IF) et par la détection de l'ADN génomique par amplification en chaîne par polymérase (PCR) qui est la technique la plus sensible pour détecter la présence du virus chez les animaux infectés persistants ; elle est particulièrement utile lorsque les prélèvements en voie de putréfaction sont impropres à l'isolement viral et à la détection antigénique. Le virus de la PPA peut être détecté par PCR à partir d'échantillons prélevés dans les premières étapes de l'infection, dans du sang prélevé sur acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) ou dans des sérums. Les porcs guéris d'infections aiguës ou chroniques présentent en général une phase de virémie de plusieurs semaines ce qui permet à la PCR d'être un outil performant pour la détection du virus chez les porcs infectés par des souches faiblement ou modérément virulentes.

Étant donné qu'il n'existe pas de vaccin contre la PPA, la présence d'anticorps témoigne d'une infection préalable comme par ailleurs ces anticorps sont produits dans la première semaine de l'infection et persistent pendant longtemps, ils sont d'excellents marqueurs de la maladie. L'apparition précoce (entre 7 et 10 jours après l'infection) et la longue persistance des anticorps permettent une utilisation des tests sérologiques (ELISA, immuno-empreinte ou test IF) pour le diagnostic des formes subaiguë ou chronique.

Dans les pays où les tiques *Ornithodoros* sont présentes, la détection du virus de la PPA dans ces réservoirs contribue à une meilleure compréhension de l'épidémiologie de la maladie. Cet aspect est déterminant dans la mise en œuvre de programmes efficaces de contrôle ou d'éradication (6).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Lorsque la PPA est suspectée, les prélèvements suivants doivent être envoyés au laboratoire : sang sur anti-coagulant (héparine ou acide éthylène-diamine-tétra-acétique [EDTA]), rate, nœuds lymphatiques, amygdale et rein. Ces prélèvements doivent être conservés au froid, sans congélation, durant le transport. Arrivés au laboratoire, ils sont conservés à -70°C si leur traitement est différé. Lorsque le maintien de la chaîne du froid ne peut être assuré, les prélèvements peuvent être placés en solution saline glycinée ; cela peut altérer légèrement la possibilité de l'identification virale, mais peut faciliter l'envoi de prélèvement au laboratoire et la confirmation d'un foyer.

- **Préparation du prélèvement pour l'hémadsorption et l'inoculation au porc**

- Préparer des suspensions de tissus en écrasant des fragments de 0,5-1 g dans un mortier contenant du sable stérile, puis ajouter de 5 à 10 ml d'une solution saline tamponnée ou de milieu de culture de tissu, contenant des antibiotiques.
- Clarifier la suspension par centrifugation à 1 000 **g** pendant 5 min.

Utiliser le surnageant pour l'hémadsorption (Section B.1.a ci-dessous) et l'inoculation au porc (Section B.1.d ci-dessous), bien que l'inoculation au porc ne soit pas recommandée.

a) Épreuve d'hémadsorption

L'épreuve d'hémadsorption (HAD) (17) repose sur le fait que les érythrocytes de porc adhèrent à la surface des monocytes et des macrophages de porc infectés par le virus PPA et que la plupart des isolats produisent ce phénomène d'hémadsorption. Un résultat positif en HAD est définitif pour le diagnostic de la PPA. Un petit nombre de virus non hémadsorbants a été isolé, la plupart de ceux-ci étant non virulents, mais certains peuvent être à l'origine de formes aiguës typiques de PPA. L'épreuve est réalisée en ajoutant du sang ou des suspensions de tissu, issus de porc suspects, dans des cultures de leucocytes de première explantation (méthode 1 ci-dessous) ou dans des cultures cellulaires de macrophages, ainsi qu'en préparant des cultures de leucocytes à partir de porcs inoculés au laboratoire ou à partir de sang de porcs suspects récolté sur le terrain (méthode 2 ci-dessous). Il est possible de préparer jusqu'à 300 cultures à partir de 100 ml de sang hépariné ou défibriné récolté. En cours de procédure, il est essentiel d'éviter la contamination des cultures.

- **Protocole 1 : Épreuve d'hémadsorption en culture de leucocytes de première explantation**

- Récolter le volume requis de sang frais de porc défibriné ou hépariné (100 unités internationales [UI]/ml de sang).
- Centrifuger à 700 **g** pendant 30 min, récupérer la couche de cellules blanches (buffy coat). Ajouter 3 volumes d'une solution à 0,83 % de chlorure d'ammonium aux leucocytes. Mélanger et incuber à température ambiante pendant 15 min. Centrifuger à 650 **g** pendant 15 min. et récupérer délicatement le surnageant. Laver le culot dans du milieu ou un tampon phosphate (PBS).
- Mettre en suspension les cellules à la concentration de 10^6 ou 10^7 cellules/ml dans un milieu de culture contenant 10 à 30 % de sérum de porc et des antibiotiques. Afin de prévenir une hémadsorption non spécifique, le milieu doit contenir le sérum ou le plasma du porc donneur de leucocytes. Si une grande quantité de prélèvements doit être éprouvée, les sérums homologues peuvent être remplacés par un sérum qui a été reconnu préalablement capable de prévenir la formation de rosettes non spécifiques.

- Répartir la suspension de cellules en aliquots de 1,5 ml dans des tubes de 160 × 16 mm et incuber en position inclinée (5 à 10° de l'horizontale) à 37°C . Ce protocole peut aussi être suivi avec des plaques à 96 puits en utilisant 200 μl /puits d'une suspension de 10^6 à 10^7 cellules par ml.

Note: pour un diagnostic de routine, des cultures de 2 à 4 jours sont suffisamment sensibles.

- Inoculer 3 tubes de cellules ou plaques en ajoutant 0,2 ml/tube ou 0,02 ml/puits de la préparation (1/10 dilution finale) de prélèvement de tissu. Il est conseillé d'inoculer des dilutions du dixième et du centième ; ce qui est particulièrement important lorsque les prélèvements de terrain sont en mauvais état.
- Inoculer des cultures témoins positives avec un virus hémadsorbant. Ne pas inoculer les témoins négatifs est essentiel si l'on veut pouvoir révéler une hémadsorption non spécifique.

- vii) Après 3 jours, ajouter 0,2 ml d'une préparation fraîche à 1 % d'érythrocytes de porc en solution saline tamponnée, dans chaque tubes. Dans le cas de plaques à 96 puits, ajouter un jour après 0,02 ml d'une suspension à 1 % d'érythrocytes de porc.
- viii) Examiner au microscope quotidiennement les cultures pendant 7 à 10 jours, à la recherche de l'effet cytopathogène (ECP) et de l'hémadsorption.
- ix) *Lecture des résultats* : l'hémadsorption consiste en l'attachement d'une grande quantité d'érythrocytes de porc sur la surface des cellules infectées. Un ECP consistant en la réduction du nombre de cellules adhérentes en l'absence d'hémadsorption, peut être dû à la cytotoxicité de l'inoculum, à un virus de la maladie d'Aujeszky ou à un virus PPA non hémadsorbant, qui peuvent être révélés par EAF sur le culot cellulaire ou par PCR (voir ci-dessous). Si aucune modification n'est observée ou si l'immunofluorescence ou la PCR sont négatives, passer le surnageant jusqu'à 3 fois de suite sur une culture fraîche de leucocytes. Tous les isolements doivent être confirmés par PCR et séquençage.

• **Protocole 2 : Épreuve « Autorosette » d'hémadsorption avec les leucocytes du sang périphérique de porcs infectés**

Cette méthode est plus rapide que celle de la préparation et de l'inoculation de cultures de leucocytes de première explantation de porc (décrite dans la méthode 1 ci-dessus) et donnera des résultats plus rapides dans les cas positifs. Elle peut être réalisée dans les laboratoires qui ne sont pas équipés pour des examens virologiques de routine ; le minimum requis consiste en des lames et lamelles, un microscope, du milieu stérile, des tubes ou flacons et des pipettes. Le sang des porcs suspects du terrain ou de ceux qui ont été inoculés au laboratoire, est récolté sur héparine et les cultures de leucocytes sont préparées pour une recherche directe de l'hémadsorption. Cependant, les résultats de l'épreuve sont difficiles à juger et elle est maintenant remplacée par la PCR.

- i) Récolter 20 ml de sang total dans une seringue contenant 2 000 UI d'héparine dans 2 ml de solution saline, mélanger et transférer dans un tube de verre ou un flacon étroit.
- ii) Placer le tube ou le flacon verticalement dans une étuve ou un bain-marie à 37 °C et laisser les cellules sédimenter. La sédimentation est améliorée par addition de 2 ml d'un expansateur de volume de plasma, tel que le « Dextran 150 » qui est une solution de Dextran 150 dans 0,9 % d'une solution de NaCl pour injection (Fisons, Royaume-Uni).
- iii) Incuber les cultures pendant 6 à 8 h à 37 °C, puis, examiner les cultures à intervalle de 2 à 3 h par transfert de petits aliquots de surnageant riche en cellules blanches avec quelques érythrocytes, sur une lame et rechercher l'hémadsorption cellulaire sous un microscope.
- iv) *Lecture des résultats* : la présence de cellules hémadsorbantes vue au microscope indique la présence du virus de la PPA. L'hémadsorption consiste en l'attachement d'une grande quantité d'érythrocytes de porc sur la surface des cellules infectées. Toute hémadsorption doit être suffisante pour décider de recommencer l'épreuve ou de confirmer la présence du virus de la PPA par d'autres tests comme la PCR.

b) Recherche antigénique par l'épreuve d'immunofluorescence

L'IF (8) peut être une méthode additionnelle de détection de l'antigène dans les tissus de porcs suspects du terrain ou de porcs inoculés au laboratoire. Un résultat positif associé à des signes cliniques et lésions appropriées constitue un diagnostic de suspicion de PPA. Elle peut être appliquée à la mise en évidence de l'antigène PPA dans les cultures de leucocytes où l'HAD n'apparaît pas et peut ainsi identifier les souches virale non hémadsorbantes. Elle différencie aussi l'ECP lié au virus PPA de celui provoqué par un autre virus tel que le virus d'Aujeszky ou en rapport avec un effet cytotoxique de l'inoculum. Cependant, il est important de noter que dans le cas d'une maladie subaiguë ou chronique, l'IF a une sensibilité relativement faible. Cette diminution de la sensibilité peut être mise en relation avec la formation de complexes antigène-anticorps dans les tissus des porcs infectés qui bloquent l'interaction entre l'antigène viral et le conjugué (26).

• **Protocole**

- i) Préparer des coupes au cryostat ou des décalques des tissus à examiner, ou étaler le sédiment cellulaire de cultures de leucocytes inoculés sur des lames ; faire sécher à l'air puis fixer à l'acétone pendant 10 min à la température ambiante.
- ii) Colorer avec une immunoglobuline anti-PPA conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) à la dilution optimale recommandée par le fabricant ou obtenue après titrage préalable, pendant 1 h à 37 °C en chambre humide.
- iii) Fixer et colorer un témoin positif et un négatif de la même manière.

- iv) Laver 4 fois en plongeant les coupes dans du PBS fraîchement préparé, monter les lames de tissus colorés en PBS/glycérol, et examiner au microscope à lumière ultra-violette avec des filtres d'excitation et barrières appropriés.
- v) *Lecture des résultats* : les tissus sont positifs si une fluorescence granuleuse cytoplasmique est observée dans la zone paracorticale des organes lymphoïdes ou dans les macrophages fixés au sein d'autres organes.

c) Mise en évidence du génome viral par la PCR

Des techniques PCR ont été développées, utilisant des amorces correspondant à une région hautement conservée du génome, permettant de détecter et d'identifier une grande variété d'isolats appartenant à tous les génotypes connus, y compris les virus non hémadsorbants et les souches de basse virulence. Les techniques PCR sont particulièrement indiquées pour détecter et identifier l'ADN viral dans les tissus de porc impropres à l'isolement viral ou à la recherche d'antigène en raison d'un début de putréfaction ou lorsque l'on a tout lieu de penser que le virus a été inactivé avant l'arrivée des prélèvements au laboratoire.

Trois méthodes PCR sont décrites et ont été validées ; elles comportent le traitement du prélèvement puis le protocole de l'épreuve. Ces protocoles constituent un guide général et un point de départ pour la réalisation de la PCR. Les conditions optimales de la réaction (temps et températures d'incubation, modèles et fournisseurs d'équipement, concentrations des réactifs tels que les amorces et les dNTPs), peuvent varier, aussi les conditions doivent-elles être d'abord évaluées.

- **Préparation du prélèvement (protocole 1)**

Cette méthode de préparation des échantillons est simple et peu coûteuse, mais peut entraîner des résultats faux négatifs du fait de la présence d'inhibiteurs de PCR (14).

- i) Préparer des suspensions tissulaires en écrasant de petits fragments de tissu dans un mortier contenant du sable stérile et faire une dilution au 1/10 en ajoutant 5 à 10 ml de PBS contenant 1 % de sérum bovin et des antibiotiques.
- ii) Centrifuger à 500 *g* pendant 5 min.
- iii) Extraction pour les témoins : homogénats tissulaires au 1/10 (même tissu que le prélèvement à analyser) : (a) un témoin négatif : utiliser 500 µl d'un homogénat de tissu négatif en PPA ; (b) un témoin positif : utiliser 500 µl d'un homogénat de tissu positif en PPA.
- iv) Transférer 500 µl dans un tube Eppendorf à bouchon à vis et porter à ébullition pendant 10 min.
- v) Centrifuger à 13 000 *g* dans une micro-centrifugeuse pendant 5 min.

Le surnageant tissulaire peut être utilisé directement dans l'épreuve de PCR.

- **Préparation du prélèvement (protocole 2) (1, 2)**

Une autre possibilité d'extraction plus coûteuse mais plus sensible faisant appel au kit commercial « High Pure PCR Template Preparation » (Roche Diagnostics) est décrite ci-dessous. Un certain nombre d'autres kits d'extraction de l'ADN sont disponibles dans le commerce pour la préparation d'une matrice pour la PCR. Ils peuvent être plus appropriés en fonction de l'échantillon à analyser. Avec cette méthode, différents échantillons sont utilisables tels que des surnageants de cultures cellulaires, du sang collecté sur EDTA, des sérums et des tissus homogénéisés même si ces derniers ont été conservés dans de mauvaises conditions de température et qu'ils ont subi un début de putréfaction. Ce protocole a l'avantage d'être utilisable pour l'extraction aussi bien de l'ADN du virus de la PPA que de l'ARN du virus de la PPC, ce qui permet une détection simultanée des deux virus dans une épreuve de PCR multiplex (2).

Le kit « High Pure PCR Template Preparation » (Roche Diagnostics) comprend les réactifs suivants : tampon de liaison, protéinase K, tampon de suppression des inhibiteurs, tampon de lavage, tubes filtres (High Pure Filter Tubes) et tubes de collecte.

Pour les prélèvements d'organes et de tissus, il faut préparer un homogénat au 1/10 dans du PBS, puis clarifier par centrifugation à 12 000 *g* pendant 5 min. Extraire l'ADN/ARN du liquide surnageant. Parfois, il est recommandé de tester en parallèle une dilution au 1/10 du surnageant.

Extraction pour les témoins : homogénats tissulaires au 1/10 (même tissu que le prélèvement à analyser) : (a) un témoin négatif : utiliser 200 µl d'un homogénat de tissu négatif en PPA ; (b) un témoin positif : utiliser 200 µl d'un homogénat de tissu positif en PPA. Les deux contrôles doivent être testés en même temps que les échantillons.

- i) Pipetter 200 µl d'échantillon dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml.
 - ii) Ajouter 200 µl de tampon de liaison et 40 µl de protéinase K. Mélanger immédiatement. Incuber pendant 10 min à 72 °C.
 - iii) Centrifuger rapidement le tube de 1,5 ml afin d'éliminer les gouttes accrochées au bouchon.
 - iv) Ajouter 100 µl d'isopropanol dans le tube de l'échantillon.
 - v) Placer la colonne filtre High Pure dans un tube de récupération et déposer avec une pipette l'échantillon dans le réservoir supérieur. Centrifuger pendant 1 min à 8 000 tr/min (avec les échantillons de sang répéter l'étape de centrifugation si l'échantillon est resté dans la colonne filtre).
 - vi) Retirer le tube de récupération et placer la colonne filtre sur un nouveau tube de récupération propre.
 - vii) Ajouter 500 µl de tampon de suppression des inhibiteurs dans le réservoir supérieur et centrifuger pendant 1 min à 8 000 tr/min.
 - viii) Retirer le tube de récupération et placer la colonne filtre dans un tube de récupération propre.
 - ix) Ajouter 450 µl de tampon de lavage dans le réservoir supérieur et centrifuger pendant 1 min à 8 000 tr/min.
 - x) Retirer le tube de récupération et répéter l'étape de lavage.
 - xi) Retirer le tube de récupération et placer la colonne filtre dans un tube de récupération propre. Centrifuger pendant 10 s à 13 000 tr/min pour éliminer le tampon de lavage résiduel.
 - xii) Retirer le tube de récupération et placer la colonne filtre dans un microtube à centrifuger de 1,5 ml.
 - xiii) Pour éluer les acides nucléiques, ajouter 500 µl d'eau stérile pré-chauffée (70 °C) dans le réservoir supérieur (faire bien attention de ne pas utiliser le tampon d'élution pour l'ARN du virus de la PPC). Centrifuger pendant 1 min à 8 000 tr/min.
 - xiv) Utiliser immédiatement ou conservé à -20 °C pour usage ultérieur.
- **Protocole 1 de la PCR (validé avec des échantillons préparés selon les protocoles 1 et 2)**
 - **Solutions stock**
 - i) La Taq polymérase d'ADN et le tampon d'amplification (10×) sont disponibles dans le commerce.
 - ii) Stock de dNTP 1,25 mM : préparer des solutions stock de 50 mM de chacun des nucléotides suivants : dATP, dCTP, dGTP et dTTP. Ajouter 10 µl de chacune de ces solutions à 360 µl d'eau distillée stérile.
 - iii) Amorce à la concentration de 20 pmol/µl : séquence de l'amorce 1 : 5'-ATGGA-TACCG-AGGGA-ATAGC-3' (brin positif) ; séquence de l'amorce 2 : 5'-CTTAC-CGATG-AAAAT-GATAC-3' (brin négatif).
 - iv) Tampon de charge : 0,25 % d'Orange G en solution aqueuse glycinée à 30 %.
 - v) *Tampon TAE (50×) pour gel d'agarose* : base Tris (242 g) ; acide acétique glacial (57,1 ml) ; EDTA 0,5 M, pH 8,0 (100 ml) ; eau distillée (q.s. pour 1 litre).
 - vi) *Marqueurs d'ADN* : des échelles de 100 paires de bases sont disponibles dans le commerce.
 - **Épreuve d'amplification PCR**
 - i) Ajouter les réactifs suivants au nombre nécessaire de tubes Eppendorf polypropylène de 0,75 ml :
Eau distillée stérile (24,5 µl) ; tampon d'amplification 10× (5 µl) ; chlorure de magnésium 25 mM (4 µl) ; solution stock à 1,25 mM de dNTP (8 µl) ; amorce 1 à 20 µM (1 µl) ; amorce 2 (1 µl) ; Taq polymérase d'ADN à 5 U/µl (0,25 µl) ; surnageant tissulaire (10 µl).
 - ii) Les tubes témoins ne contiennent pas de surnageant tissulaire.
Témoins négatif (pas d'ADN) : ajouter 10 µl d'eau distillée.
Témoins positif : ajouter 2 µl d'ADN PPA et 8 µl d'eau distillée.
 - iii) Recouvrir le mélange de 60 µl d'huile minérale, si nécessaire.
 - iv) Placer tous les tubes dans un thermo-cycleur ADN et conduire le programme suivant :
1 cycle à 94 °C pendant 5 min.
35 cycles à 94 °C durant 1 min, 50 °C durant 1 min et 72 °C pendant 1 min.
1 cycle à 72 °C durant 10 min.
Maintenir à 4 °C.

- v) À la fin du programme, prélever délicatement 20 µl de chaque mélange réaction au dessous de l'huile minérale, les transférer dans un tube propre et ajouter 2 µl de tampon de chargement.
- vi) Charger tous les échantillons dans un gel à 2 % d'agarose en tampon TAE contenant du bromure d'éthidium, à une concentration finale de 0,5 µg/ml.
Ajouter le marqueur ADN sur une piste de chaque côté du gel.
- vii) Soumettre le gel à une tension constante de 100 volts pendant 20 à 30 min.
- viii) Lecture des résultats : observer le gel sous une source UV. Lors d'échantillon positif, une légère bande sera présente qui devra migrer au même niveau que le produit PCR du témoin positif. Calculer la taille des produits PCR dans les échantillons éprouvés et le témoin positif par comparaison aux marqueurs de référence. Le produit PCR du témoin positif a une taille de 278 paires de bases. Aucune bande ne doit être vue dans le témoin négatif.

- **Protocole 2 de la PCR (validé avec des échantillons préparés selon le protocole 2) (1)**

Afin d'obtenir des niveaux de sensibilité maximums, cette épreuve de PCR décrite dans la référence 1 est recommandée pour des échantillons préparés selon le protocole 2. Les amorces du virus de la PPA décrites dans le protocole peuvent être combinées avec un jeu d'amorces spécifiques du virus de la PPC dans une épreuve de RT-PCR multiplex qui permet la détection simultanée et la différenciation des deux virus en une seule épreuve (2).

- **Solutions stock**

Eau stérile sans nucléase.

La polymérase Taq Gold DNA, le tampon II pour PCR ×10 et le chlorure de magnésium sont disponibles dans le commerce chez *Applied Biosystems*.

Le mélange de nucléotides comprenant 10 mM de chaque dNTP est disponible dans le commerce chez *Roche Diagnostics*.

Les amorces à la concentration de 20 pmol/µl :

Séquence de l'amorce 1 : 5'-AGT-TAT-GGG-AAA-CCC-GAC-CC-3' (amorce sens) ; séquence de l'amorce 2 : 5'-CCC-TGA-ATC-GGA-GCA-TCC-T-3' (amorce anti-sens).

Tampon de charge ×10 : 0,2 % de xylène cyanol, 0,2 % de bleu de bromophénol, et 30 % de glycérol.

Tampon TAE (×50) pour gel d'agarose : base Tris (242 g), acide acétique glacial (57,1 ml), EDTA 0,5 M, pH 8,0 (100 ml) et eau distillée (qsp 1 l).

Marqueur ADN : une échelle de 100 paires de bases est disponible dans le commerce.

- **Amplification PCR**

- i) Dans un tube à micro-centrifugation stérile de 1,5 ml, préparer, pour chaque échantillon, le mélange réaction PCR décrit ci-dessous. Préparer le mélange réaction en quantité suffisante pour le nombre d'échantillons à tester mais en ménageant la possibilité de traiter un échantillon supplémentaire.
- ii) Eau exempte de nucléase ou eau stérile (17,375 µl) ; tampon II pour PCR ×10 (2,5 µl) ; chlorure de magnésium 25 mM (2 µl), mélange dNTP 10 mM (0,5 µl) : amorce 1, 20 pmol/µl (0,25 µl) ; polymérase Taq Gold DNA 5 U/µl (0,125 µl).
- iii) Ajouter 23 µl du mélange réaction PCR au nombre nécessaire de tubes pour PCR de 0,2 ml.
- iv) Ajouter 2 µl d'extrait d'échantillon à chaque tube. Inclure un témoin positif (2 µl d'ADN du virus de la PPA) et un témoin négatif (2 µl d'eau distillée) pour chaque test de PCR.
- v) Placer tous les tubes dans un thermocycleur automatique et appliquer le programme suivant :
 - 1 cycle à 95 °C de 10 min
 - 40 cycles à 95 °C de 15 s, 62 °C de 30 s et 72 °C de 30 s.
 - 1 cycle à 72 °C de 7 min.
 - Maintenir à 4 °C.
- vi) À la fin du programme, retirer les tubes de PCR et ajouter 2,5 µl de tampon de charge ×10 dans chaque tube.
- vii) Déposer tous les échantillons sur un gel d'agarose à 2 % dans du tampon TAE contenant du bromure d'éthidium à la concentration finale de 0,5 µg/ml.

- viii) Ajouter les marqueurs d'ADN sur une piste de chaque côté du gel.
- ix) Soumettre le gel à un voltage constant de 150 à 200 volts pendant environ 30 min.
- x) *Lecture des résultats* : Examiner les gels sous rayons UV. Dans le cas d'un échantillon positif, une bande discrète est présente qui doit migrer de la même manière que le témoin positif. Calculer la taille du produit amplifié en comparant avec le témoin positif et l'échelle des marqueurs d'ADN. Le produit de PCR du témoin positif a une taille de 257 paires de bases. Aucune bande ne doit apparaître dans la piste du témoin négatif.
- xi) *En option* : Une épreuve supplémentaire peut éventuellement être réalisée par digestion du produit amplifié avec l'endonucléase de restriction BsmA I. Pour cette épreuve, incubé à 55 °C pendant 2 h 1/2 : 5 µl de produit amplifié dans un volume final de 20 µl de mélange de digestion (2 µl de tampon ×10, 1 µl de BsmA I [5 U/µl] et 12 µl d'eau distillée stérile). Par la suite, pratiquer une électrophorèse dans un gel d'agarose à 3 % comme décrit ci-dessus. Le profil de digestion d'un échantillon positif comprend deux fragments de 173-177 pb et de 80-84 pb.

• **Protocole 3 de PCR : TaqMan® PCR (15, 30)**

• **Préparation du prélèvement**

La méthode décrite ci-dessous est celle publiée sous la référence 15. Un certain nombre de kits d'extraction de l'ADN sont commercialisés pour la préparation d'échantillons utilisables en PCR selon le prélèvement soumis à l'analyse et peuvent être utilisés dans les laboratoires de référence.

Le Protocole Mini Kit ARN viral QIAamp® (QIAGEN) (spin protocole) est décrit ci-dessous. Ce kit de diagnostic peut être utilisé pour traiter le sang d'animaux suspects de peste porcine. Le sang de porcs infectés doit être recueilli sur EDTA. Dans ce cas, la détection du virus de la PPA peut être réalisée en parallèle avec celle du virus de la peste porcine classique (voir Chapitre 2.8.3., « Peste porcine classique », dans les méthodes de détection moléculaire).

- i) Placer 560 µl du tampon AVL fourni, dans un tube de micro-centrifugation de 1,5 ml.
- ii) Ajouter 140 µl d'échantillon à tester ou d'échantillon témoin et mélanger au vortex par impulsions successives, pendant environ 15 s. Des échantillons témoins négatifs d'homogénats de rate, de moelle osseuse et de cellules mononuclées de sang périphérique, prélevés sur des porcs non infectés, devront être traités en même temps que les échantillons soumis à l'épreuve. Une extraction supplémentaire de témoins négatifs peut aussi être préparée pour chaque échantillon soumis et le témoin négatif non infecté en réalisant, en même temps, des extractions de l'eau exempte de nucléase pour servir de blanc (tous les témoins devront ensuite être soumis à la PCR en parallèle avec les échantillons éprouvés).
- iii) Incuber à température ambiante au moins 10 min.
- iv) Centrifuger brièvement le tube pour récupérer les gouttes de l'intérieur du couvercle.
- v) Ajouter 560 µl d'éthanol à l'échantillon, passer au vortex en pulsations pendant environ 15 s et centrifuger brièvement le tube pour récupérer les gouttes de l'intérieur du couvercle.
- vi) Ajouter 630 µl de la solution v) à une colonne QIAamp spin (dans un tube de récupération de 2 ml) sans mouiller le bord. Boucher le tube et centrifuger pendant 1 min à 6 000 *g*. Placer la colonne spin dans un nouveau tube de récupération propre et éliminer le tube contenant le filtrat.
- vii) Ouvrir délicatement la colonne QIAamp spin et répéter l'étape vi).
- viii) Ouvrir délicatement la colonne QIAamp spin et ajouter 500 µl de tampon AW1. Boucher et centrifuger pendant 1 min à 6 000 *g*. Placer la colonne spin dans un nouveau tube de récupération propre de 2 ml et éliminer le tube contenant le filtrat.
- ix) Ouvrir délicatement la colonne QIAamp spin et ajouter 500 µl de tampon AW2. Boucher et centrifuger pendant 3 min à 20 000 *g*.
- x) Placer la colonne QIAamp spin dans un nouveau tube de micro-centrifugation de 1,5 ml. Éliminer l'ancien tube de récupération contenant le filtrat. Ouvrir délicatement la colonne QIAamp spin et ajouter 60 µl de tampon AVE. Boucher et incubé à la température ambiante pendant 1 min. Centrifuger 1 minute à 6 000 *g*.
- xi) Éliminer la colonne QIAamp spin. Conserver l'extrait d'ADN (60 µl) à –20 °C jusqu'à son utilisation en PCR.

- **Solutions stock**

- Eau stérile exempte de nucléases ou toute autre eau stérile appropriée et TaqMan® PCR reaction master mix (×2).
- Amorces à la concentration de 50 pmol/μl ; Amorce 1, séquence : 5'-CTGCT-CATGG-TATCA-ATCTT-ATCGA-3' (brin positif) ; Amorce 2, séquence : 5'-GATAC-CACAA-GATC(AG)-GCCGT-3' (brin négatif).
- Sonde TaqMan® à la concentration de 5 pmol/μl : (5'-[6-carboxy-fluorescein (FAM)]-CCACG-GGAGG-AATAC-CAACC-CAGTG-3'-[6-carboxy-tetraméthyl-rhodamine (TAMRA)]).

- **Amplification PCR par l'épreuve TaqMan® (15)**

- Dans un tube à micro-centrifugation stérile de 1,5 ml, préparer, pour chaque échantillon, le mélange réaction PCR décrit ci-dessous. Préparer le mélange réaction en quantité suffisante pour le nombre d'échantillons à tester mais en ménageant la possibilité de traiter un échantillon supplémentaire.

Eau exempte de nucléase ou eau stérile (7,5 μl) ; TaqMan® PCR reaction master mix, 2x conc. (12,5 μl) ; amorce 1,50 pmol (1 μl) ; amorce 2,50 pmol (1 μl) ; sonde TaqMan®, 5 pmol (1 μl).
- Ajouter 22 μl du mélange réaction PCR à un puits d'une plaque à lecture optique MicroAmp® pour chaque échantillon à tester.
- Ajouter 3 μl d'extrait d'échantillon ou de témoins préalablement préparés (voir ci-dessus) et fermer avec soin chaque puits.
- Faire tourner la plaque pendant 1 min dans une centrifugeuse adaptée afin de mélanger le contenu de chaque puits.
- Placer la plaque dans un TaqMan® Sequence Detection System par amplification PCR et appliquer le programme suivant :
1 cycle à 50 °C de 2 min ;
1 cycle à 95 °C de 10 min ;
40 cycles à 95 °C de 15 s, à 58 °C de 1 min.

Note : Si un TaqMan® thermo-cycleur n'est pas disponible, un thermo-cycleur ordinaire peut être utilisé et les produits PCR sont alors analysés par des lecteurs de point final de fluorescence ou bien par électrophorèse sur un gel à 1,5 % d'agarose. Un produit de 250 pb doit être obtenu.
- Lecture des résultats** : affecter une valeur cycle-seuil (C_T) à chaque réaction PCR à l'aide d'un balayage de tous les foyers d'amplification (un foyer de signal fluorescent sur le nombre de cycles). Les échantillons à tester négatifs, les témoins non infectés et les blancs doivent avoir une valeur de $C_T > 40,0$. Les échantillons à tester positifs et les témoins positifs doivent avoir une valeur de $C_T < 40,0$ (les échantillons fortement positifs ont une valeur $C_T < 30,0$).

d) Inoculation de porcs

Autrefois, l'inoculation au porc a été utilisée pour différencier la PPC de la PPA en raison d'une similitude des signes cliniques. Les prélèvements étaient inoculés à deux groupes de porcs, l'un ayant été vacciné contre la PPC, l'autre pas. Cette épreuve n'est plus nécessaire aujourd'hui dans la mesure où il existe des épreuves de laboratoire qui donnent des résultats fiables à la fois pour la PPC et pour la PPA. L'inoculation au porc est lente à répondre, chère, difficile à réaliser et entraîne une souffrance importante des animaux qui n'est plus acceptable. Aussi cette méthode n'est-elle désormais plus recommandée.

2. Épreuves sérologiques

Chez les porcs guéris, les anticorps persistent longtemps après l'infection, parfois toute la vie, et un certain nombre d'épreuves sont disponibles pour mettre en évidence ces anticorps ; cependant peu d'entre eux ont été retenus pour le diagnostic de routine au laboratoire (3, 11, 19, 21, 25). La méthode la plus utilisée est l'ELISA (27, 29), qui permet d'examiner soit le sérum soit les liquides organiques. Une analyse de confirmation d'échantillons positifs en ELISA doit être faite dans les cas critiques à l'aide d'une autre épreuve, telle que l'immunofluorescence indirecte (IFI) (24), la coloration à l'immuno-peroxidase ou l'immuno-empreinte (11, 22). Les anticorps ne sont pas habituellement détectés chez le porc infecté avec un virus PPA virulent car il meurt avant leur apparition. En revanche, des titres élevés sont obtenus chez les porcs infectés par des souches virales de virulence basse ou modérée, mais ils ne sont pas totalement neutralisants.

Dans les régions où la PPA est enzootique, la confirmation des cas suspects de maladie par un test ELISA validé est pleinement valable, en combinaison avec une épreuve sérologique complémentaire (IFI) ou de détection antigénique (EAF). Dans certains pays, plus de 95 % des cas positifs ont été identifiés en utilisant la combinaison IFI et EAF (26).

Il faut noter que lorsque les porcs ont été infectés avec des souches avirulentes ou de basse virulence, les épreuves sérologiques peuvent être les seuls moyens de détecter les animaux infectés.

La contre-immunoélectrophorèse et l'ELISA peuvent être appliqués à des analyses sériques à grande échelle, bien que l'ELISA soit plus sensible pour détecter les sérums positifs individuels et qu'il ait été largement utilisé dans le cadre de programmes d'éradication (5).

La méthode retenue dépend du personnel et des moyens matériels disponibles.

a) Méthode immuno-enzymatique (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

L'ELISA (3, 21) est une épreuve directe capable de détecter les anticorps PPA chez les porcs infectés par des virus de basse ou moyenne virulence. Des kits ELISA sont disponibles dans le commerce. Ils se sont révélés hautement spécifiques et sensibles. Une autre technique moins coûteuse consiste à préparer un antigène soluble pour l'utiliser dans un ELISA indirect comme décrit ci-dessous.

Les ELISA ont une sensibilité réduite quand les sérums à tester sont mal conservés. Pour résoudre ce problème, plusieurs ELISA récents qui utilisent une protéine recombinante du virus de la PPA sont en cours de validation (13).

Lors d'un résultat douteux ou d'un résultat positif sur des sérums mal conservés, il est recommandé de pratiquer un second test de confirmation tel que l'immuno-empreinte ou l'IFI décrits ci-dessous

- **Préparation de l'antigène pour ELISA**

L'antigène ELISA est préparé à partir de cellules infectées cultivées en présence de sérum de porc (12).

- i) Infecter des cellules MS (pour *Monkey Stable*) à une multiplicité d'infection de 10 avec une souche adaptée, et incubé en milieu contenant 2 % de sérum de porc.
- ii) Récolter les cellules après 36 à 48 h post-infection, lorsque l'ECP est bien marqué. Laver en PBS, centrifuger à 650 *g* pendant 5 min, laver le culot cellulaire dans du sucrose 0,34 M en Tris/HCl 5 mM, pH 8,0, et culotter les cellules par centrifugation.

Effectuer les étapes (iii) à (v) sur glace :

- iii) Reprendre le culot cellulaire dans du sucrose 67 mM en Tris/HCl 5 mM, pH 8,0 (1,8 ml par flacon de 175 cm²), et laisser reposer pendant 10 min avec une agitation après 5 min.
- iv) Ajouter du détergent non ionique Nonidet P-40 à une concentration finale de 1 % (poids/volume), et laisser reposer 10 min (agitation après 5 minutes) pour lyser les cellules.
- v) Ajouter du sucrose à une concentration finale de 64 % (poids/poids) en Tris/HCl 0,4 M, pH 8,0, et centrifuger à 1 000 *g* pendant 10 min pour culotter les noyaux.
- vi) Récupérer le surnageant et ajouter de l'EDTA (à une concentration finale de 2 mM), du bêta-mercaptoéthanol (concentration finale de 50 mM) et du NaCl (concentration finale de 0,5 M) en Tris/HCl 0,25 mM, pH 8,0, puis incubé pendant 15 min à 25 °C.
- vii) Centrifuger à 100 000 *g* pendant 1 h à 4 °C sur une couche de 20 % de sucrose (poids/poids) en Tris/HCl 50 mM, pH 8,0.

Prélever la bande située immédiatement au-dessus de la couche de sucrose et l'utiliser comme antigène ELISA. La conserver à -20 °C.

- **Protocole (3, 21)**

- i) Fixer l'antigène sur les plaques de micro-titrage en ajoutant 100 µl de la dilution recommandée ou pré-titrée de l'antigène dans du tampon carbonate/bicarbonate 0,05 M, pH 9,6, dans chaque puits.
- ii) Incuber à 4 °C pendant 16 h (durant une nuit), puis laver 5 fois avec du Tween 20 à 0,05 % en PBS, pH 7,2.

- iii) Diluer le sérum à tester et les sérums témoins positif et négatif au 1/30 dans du Tween 20 à 0,05 % en PBS, pH 7,2, et ajouter 100 µl de chaque dilution sérique dans 2 puits contigus d'une plaque revêtue de l'antigène.

Si 4 paires de chaque sérum témoins positif et négatif sont réparties en différentes localisations de la plaque, 40 sérums peuvent être testés en double sur une même plaque comme le montre le schéma de plaque ci-dessous.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+											–
B	+											–
C				+					–			
D				+					–			
E				–					+			
F				–					+			
G	–											+
H	–											+

- iv) Incuber les plaques à 37 °C pendant 1 h (éventuellement sur un plateau d'agitation), puis laver 5 fois avec du Tween 20 à 0,05 % en PBS.
- v) À chaque puits, ajouter 100 µl de conjugué protéine-A/peroxidase de raifort à la dilution recommandée ou pré-déterminée en Tween 20 à 0,05 % en PBS.
- vi) Incuber les plaques à 37 °C pendant 1 h, puis laver 5 fois en Tween 20 à 0,05 % en PBS.
- vii) *Substrat* : ajouter du peroxyde d'hydrogène à la solution de substrat (0,04 % d'orthophénylènediamine [OPD] en tampon phosphate/citrate, pH 5,0) à raison de 10 µl/25 ml, et répartir 100 µl de substrat dans chaque puits.

À la place de l'OPD, on peut aussi utiliser une solution de substrat DMAB/MBTH : ajouter 200 µl de substrat dans chaque puits (10 ml d'une solution DMAB 80,6 mM + 10 ml d'une solution MBTH 1,56 mM + 5 µl de H₂O₂).

Préparation du substrat DMAB/MBTH :

DMAB – 3-acide diméthyl-aminobenzoïque (SIGMA D-1643) ; MBTH – 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride monohydrate (SIGMA M-8006).

Solution de DAMB 80,6 mM : dissoudre 13,315 g d'acide DAMB dans 1 000 ml d'un tampon phosphate 0,1 M, pH 7 (5,3 g de KH₂PO₄, 8,65 g de Na₂HPO₄ dans 1000 ml d'eau distillé) par agitation constante pendant 1 h à température ambiante, ajuster le pH à 7 avec NaOH (5 M). Filtrer sur gaze.

Solution de MBTH 1,56 mM : dissoudre 0,3646 g de MBTH dans 1 000 ml d'un tampon phosphate 0,1 M, pH 7 (5,3 g de KH₂PO₄, 8,65 g de Na₂HPO₄ dans 1 000 ml d'eau distillée) par agitation constante pendant 1 h à température ambiante, ajuster le pH à 6,25 avec de l'acide chlorique concentré. Filtrer sur gaze.

Le volume nécessaire pour une plaque est : 10 ml DMAB + 10 ml MBTH + 5 µl H₂O₂ à 30 %.

Le substrat peut être préparé sous forme de solutions stocks et réparti en fractions aliquotes et conservé à –20 °C. Le mélange des solutions DAMB et MBTH (à parties égales) est réalisé extemporanément et la quantité ad hoc de H₂O₂ à 30 % est ajoutée.

- viii) Incuber à température ambiante durant environ 6 à 10 min (jusqu'à ce que le témoin négatif commence à se colorer) ; le temps nécessaire au développement de la couleur dépend à la fois, de la température du substrat au moment de la répartition dans les puits et de la température de la pièce.
- ix) Stopper la réaction en ajoutant 100 µl d'acide sulfurique 1,25 M à chaque puits.
- x) *Lecture des résultats* : les sérums positifs présentent une couleur claire (jaune dans le cas de l'OPD, bleue dans le cas du substrat DMAB/MBTH) et peuvent être lus à l'œil nu, mais pour s'assurer que tous les positifs aient été identifiés, il est nécessaire d'apprécier la densité optique (DO) dans chaque puits au spectrophotomètre, à 492 nm (substrat OPD) ou à 600-620 nm (substrat DMAB/MBTH), sur un lecteur ELISA. Avec le substrat OPD, tout sérum sera considéré positif s'il présente une valeur de

DO supérieure à deux fois la moyenne des DO obtenues sur les témoins négatifs de la plaque. Avec le substrat DMAB/MBTH, le seuil doit être calculé selon l'équation suivante :

Seuil CUT-OFF : $DO \text{ d'un sérum négatif} \times 1 + DO \text{ d'un sérum positif} \times 0,2$

b) Épreuve d'immunofluorescence indirecte

Cette épreuve (20) doit être utilisée en confirmation, pour les sérums provenant de zones indemnes de PPA et positifs en ELISA, ainsi que pour les sérums provenant de zones d'enzootie pour lesquels il est difficile de conclure en ELISA.

• **Protocole**

- i) Préparer une suspension de cellules de rein de porc ou de singe infectées par le virus PPA à une concentration de 5×10^5 cellules/ml, étaler de petites gouttes de celle-ci sur une lame, sécher à l'air puis fixer à l'acétone à la température ambiante pendant 10 min. Noter que les lames peuvent alors être stockées à -20°C jusqu'à utilisation.
- ii) Inactiver à la chaleur les sérums à tester, à 56°C pendant 30 min.
- iii) Ajouter les dilutions appropriées des sérums à tester et des sérums témoins négatif et positif, réalisées en solution saline tamponnée, sur les lames comportant à la fois des cellules infectées et des cellules témoins non infectées ; incubé pendant 1 h à 37°C en chambre humide.
- iv) Laver les lames en les immergeant 4 fois dans du PBS fraîchement préparé, puis à l'eau distillée.
- v) Ajouter la dilution pré-déterminée ou recommandée de conjugué immunoglobuline anti-porc/FITC ou de protéine-A/FITC sur toutes les lames ; incubé à 37°C pendant 1 h en chambre humide.
- vi) Laver les lames en les immergeant 4 fois dans du PBS fraîchement préparé, puis à l'eau distillée, monter en PBS/glycérol puis examiner au microscope à ultraviolet avec des filtres de barrière et d'excitation convenables.
- vii) *Lecture des résultats* : le sérum témoin positif sur les cellules infectées doit être positif et tous les autres témoins doivent être négatifs avant que les sérums à tester ne soient lus. Les sérums sont jugés positifs si les cellules infectées montrent une fluorescence spécifique.

c) Épreuve d'immuno-empreinte (11, 22)

Cette épreuve doit être effectuée en alternative à l'IFI pour confirmer des résultats douteux sur des sérums individuels. L'épreuve d'immuno-empreinte est très spécifique et permet une interprétation plus facile et plus objective des résultats ainsi qu'une meilleure reconnaissance des échantillons faiblement positifs.

Les protéines virales qui induisent des l'apparition des anticorps spécifiques chez le porc ont été identifiées. Ces polypeptides ont été fixés sur des bandes d'antigène et il a été démontré dans des épreuves d'immuno-empreintes qu'ils réagissaient dès le 9^e jour après infection.

• **Préparation des bandes d'antigène**

- i) Préparer des protéines cytoplasmiques solubles virales comme décrit pour la préparation de l'antigène ELISA à la Section B.2.a.
- ii) Les séparer par électrophorèse dans un gel à 17 % d'acryl-amide/N,N'-diallyltartardiamide (DATD), à l'aide d'une échelle normalisée de poids moléculaire appropriée.
- iii) Transférer les protéines sur des membranes de nitrocellulose $14 \times 14 \text{ cm}^2$, par électrophorèse à courant constant de 5 mA/cm, en tampon de transfert (20 % de méthanol dans glycine 196 mM, 25 mM de Tris/HCl, pH 8,3).
- iv) Sécher la membrane et marquer le côté où les protéines ont été transférées.
- v) Découper une bande à partir du bord du filtre et effectuer le protocole de l'immuno-empreinte décrit ci-dessous. Identifier la région contenant les protéines de 23 à 35 kDa à l'aide du marqueur de poids moléculaire développé en parallèle et découper cette région en étroites bandes de 0,5 cm. Marquer chaque bandes sur le côté où le transfert des protéines a eu lieu.

Ces bandes (d'environ 4 cm de long) constituent les bandes antigène utilisées en immuno-empreinte et contiennent les protéines avec lesquelles les anticorps porcins sériques, apparus à la fois dans les formes aiguës et chez les convalescents, vont réagir.

- **Préparation de la solution substrat de chloronaphtol**

Cette solution doit être préparée au moment de l'emploi.

- Dissoudre 6 mg de 4-chloro-1-naphtol dans 2 ml de méthanol et ajouter lentement cette solution à 10 ml de PBS tout en remuant.
- Éliminer le précipité blanc qui se forme par filtration à travers un papier filtre Whatman No.1 (optionnel).
- Ajouter 4 µl de peroxyde d'hydrogène.

- **Protocole**

Les bandes antigène doivent être maintenues la face marquée vers le haut, durant toute la réalisation de l'immuno-réaction.

- Placer les bandes antigène dans le tampon de saturation (2 % de lait en poudre écrémé en PBS) à 37 °C pendant 30 min, sous agitation continue.
- Préparer des dilutions au 1/40 des sérums à tester et des sérums témoins positif et négatif dans le tampon de saturation.
- Incuber les bandes antigène dans le sérum correspondant, à 37 °C, pendant 45 min, sous agitation continue. Incuber une bande antigène dans le sérum témoin positif et une autre dans le sérum témoin négatif. Ces deux bandes servent de témoins. Laver 4 fois dans le tampon de saturation, le lavage final doit durer 5 min en agitation continue.
- Ajouter le conjugué protéine-A/péroxydase de raifort à la dilution en tampon de saturation, recommandée ou obtenue d'un pré-titrage (habituellement dilution au 1/1000), à toutes les bandes antigène. Incuber à 37 °C, pendant 45 min, en agitation continue. Laver 4 fois en tampon de saturation ; le lavage final doit durer 5 min en agitation continue.
- Préparer la solution de substrat, l'ajouter aux bandes antigène et incuber à la température ambiante pendant 5 à 15 min en agitation continue.
- Stopper la réaction avec de l'eau distillée, lorsque les bandes de protéines sont suffisamment sombres.
- Lecture des résultats** : Les sérums positifs réagissent avec plus d'une protéine sur la bande antigène ; ils doivent donner un même motif protéinique et la même intensité de couleur que les bandes antigène colorées par le sérum positif de contrôle.

d) Épreuve de contre-immunoélectrophorèse (immunoélectro-osmophorèse)

Cette épreuve (19) peut être conduite rapidement et les anticorps spécifiques peuvent être détectés dans certains sérums, 30 min après sa mise en œuvre. Elle nécessite un équipement d'électrophorèse (chambre d'électrophorèse, lames support, cutter de gel) et un générateur de courant constant de 500 volts. En raison de sa faible sensibilité, cette épreuve est recommandée pour l'étude de groupes de porcs, mais pas pour des analyses individuelles.

- **Protocole**

- Placer le nombre requis de lames de verre de 2,5 × 10 cm sur le support, sur une table à niveau horizontal, et recouvrir les lames avec le volume nécessaire d'agarose à 0,6 % en tampon véronal/acétate, pH 8,6 (force ionique de 0,025) contenant 0,1 % d'azide de sodium, et laisser reposer.
- Découper 4 paires de puits de 3 mm de diamètre, séparées de 10 mm, dans le gel de chaque plaque comme montré ci-dessous.



(S = sérum ; Ag = antigène ; + = électrode positive ; - = électrode négative)

- iii) Remplir les puits avec les réactifs appropriés, y compris ceux correspondant aux témoins positif et négatif des sérums et des antigènes, à l'aide de tubes capillaires (hématocrite).
- iv) Placer les supports de lames dans la chambre à électrophorèse et faire migrer pendant 30 min sous un courant constant de 19 volts/cm.
- v) Après migration, examiner les lames sous une source indirecte de lumière pour rechercher les lignes spécifiques de précipitation.
- vi) Laver les lames dans une solution de NaCl à 2 % pendant une nuit, puis pendant 2 h dans de l'eau distillée changée plusieurs fois, avant séchage.
- vii) Colorer les lames séchées à l'amido black à 0,075 % dans des volumes égaux de méthanol, d'acide acétique à 12 %, d'acétate de sodium à 1,6 %, renfermant 0,007 % de glycérol, pendant 5 à 10 min, puis décolorer par 3 lavages de 10 min dans une solution de 45 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique glacial.
- viii) *Lecture des résultats* : Sur les lames colorées, les lignes de précipitation observées entre les puits de l'antigène et un sérum testé positif doivent être identiques à celles formées entre l'antigène et le sérum témoin positif.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

A l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin contre la PPA.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AGÜERO M., FERNÁNDEZ J., ROMERO L., SANCHEZ C., ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2003). Highly sensitive PCR assay for the routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples, *J. Clin. Microbiol.*, **41** (9), 4431–4434.
2. AGÜERO M., FERNÁNDEZ J., ROMERO L., ZAMORA M.J., SANCHEZ C., BELÁK S., ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2004) A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever. *Vet. Res.*, **35**, 1–13.
3. ARIAS M. & SANCHEZ VIZCAINO J.M. (1992). Manual de diagnóstico serológico de la peste porcina africana. (Manual of diagnostic serology for African swine fever.) Ministry of Agriculture, CISA-INIA, Valdeolmos-28130 Madrid, Spain, 1–44.
4. ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2002). African swine fever. *In*: Trends in Emerging Viral Infections of Swine, Iowa State University press, pp 119–124. ISBN 0813803837.
5. ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2002). African swine fever eradication: the Spanish model. *In*: Trends in Emerging Viral Infections of Swine, Iowa State University Press, pp 133–139. ISBN 0813803837.
6. BASTO A.P., PORTUGAL R.S., NIX R.J., CARTAXEIRO C., BOINAS F., DIXON L.K., LEITAO A. & MARTINS C. (2006). Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus*. *Arch. Virol.*, **151** (4), 819–826.
7. BLASCO R., AGÜERO M., ALMENDRAL J.M. & VIÑUELA E. (1989). Variable and constant region in African swine fever virus DNA. *Virology*, **168**, 330–338.
8. BOOL P.H., ORDAS A. & SANCHEZ BOTIJA C. (1969). El diagnostico de la peste porcina africana por inmunofluorescencia. (The diagnosis of African swine fever by immunofluorescence). *Bull. OIE*, **72**, 819–839.
9. BOSHOF C.I., BASTOS A.D., GERBER L.J. & VOSLOO W. (2007). Genetic characterisation of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973–1999). *Vet. Microbiol.*, **121** (1–2), 45–55.
10. CARRILLO C., BORCA M.V., AFONSO C.L., ONISK D.V. & ROCK D.L. (1994). Long-term persistent infection of swine monocytes/macrophages with African swine fever virus. *J. Virol.*, **68**, 580–583.

11. ESCRIBANO J.M., PASTOR M.J., ARIAS M. & SANCHEZ VIZCAINO J.M. (1990). Confirmación de sueros positivos a ELISA-peste porcina africana, mediante la técnica de 'Immunoblotting'. Utilización de las proteínas inducidas por el virus cone pesosmoleculares comprendidos entre 23 y 35 kilodaltons, en el desarrollo de un 'kit' de diagnóstico. (Confirmation of sera positive by ASF ELISA with the immunoblotting technique. Use of virus-induced proteins of 23–25 kDa in the development of a diagnostic kit.) *Med. Vet.*, **7**, 135–141.
12. ESCRIBANO J.M., PASTOR M.J. & SANCHEZ VIZCAINO J.M. (1989). Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: implications for false positive reactions in the serodiagnosis of African swine fever. *Am. J. Vet. Res.*, **50**, 1118–1122.
13. GALLARDO C., BLANCO E., RODRÍGUEZ M.J., CARRASCOSA A. & SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (2006). Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells. *J. Clin Microbiol.*, **44** (3), 1489–1495.
14. GONZAGUE M., PLIN C., BAKKALI-KASSIMI L., BOUTROUILLE A. & CRUCIERE C. (2002). Development of an internal control for the detection of the African swine fever virus by PCR. *Mol. Cell. Probes*, **16**, 237–242.
15. KING D.P., REID S.M., HUTCHINGS G.H., GRIERSON S.S., WILKINSON P.J., DIXON L.K., BASTOS A.D.S. & DREW T.W. (2003). Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J. Virol. Methods*, **107**, 53–61.
16. LUBISI B.A., BASTOS A.D., DWARKA R.M. & VOSLOO W. (2005). Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa. *Arch Virol.*, **150** (12), 2439–2452.
17. MALMQUIST W.A. & HAY D. (1960). Haemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am. J. Vet. Res.*, **21**, 104–108.
18. NIX R.J., GALLARDO C., HUTCHINGS G., BLANCO E. & DIXON L.K. (2006). Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch Virol.*, **151** (12), 2475–2494. Epub 2006 Jul 3.
19. PAN I.C., DE BOER C.J. & HESS W.R. (1972). African swine fever: application of immuno-electro-osmophoresis for the detection of antibody. *Can. J. Comp. Med.*, **36**, 309–316.
20. PAN I.C., TRAUTMAN R., HESS W.R., DE BOER C.J., TESSLER J., ORDAS A., SANCHEZ BOTIJA C., OVEJERO J. & SANCHEZ M.C. (1974). African swine fever: comparison of four serotests on porcine serums in Spain. *Am. J. Vet. Res.*, **35**, 787–790.
21. PASTOR M.J., ARIAS M. & ESCRIBANO J.M. (1990). Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody. *Am. J. Vet. Res.*, **51**, 1540–1543.
22. PASTOR M.J., LAVIADA M.D., SANCHEZ VIZCAINO J.M. & ESCRIBANO J.M. (1989). Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay. *Can. J. Vet. Res.*, **53**, 105–107.
23. PHOLOGANE S.B., BASTOS A.D. & PENRITH M.L. (2005). Intra- and inter-genotypic size variation in the central variable region of the 9RL open reading frame of diverse African swine fever viruses. *Virus Genes.*, **31** (3), 357–360.
24. SANCHEZ BOTIJA C., ORDAS A. & GONZALES J.G. (1970). La inmunofluorescencia indirecta aplicada a la investigación de anticuerpos de la peste porcina africana. Su valor para el diagnóstico. (Indirect immunofluorescence for the investigation of African swine fever antibodies. Its value for diagnosis). *Rev. Patron. Biol. Anim.*, **14**, 159–180.
25. SANCHEZ VIZCAINO J.M. (1987). African swine fever diagnosis. In: African Swine Fever, Becker Y., ed. Martinus Nijhoff, Boston, USA, 63–71.
26. SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (2006). African swine fever. In: Diseases of Swine, Ninth Edition, Straw B., D'Allaire S., Mengeling W., Taylor D., eds. Iowa State University, USA, pp. 291–298.
27. SANCHEZ VIZCAINO J.M., CROWTHER J.R. & WARDLEY R.C. (1983). A collaborative study on the use of the ELISA in the diagnosis of African swine fever. In: African Swine Fever. (CEC/FAO Research Seminar, Sardinia, Sept. 1981). Wilkinson P.J., ed. Commission of the European Communities Publication EUR 8466 EN, 297–325.

28. VINUELA E. (1985). African swine fever. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **116**, 151–170.
29. WARDLEY R.C., ABU ELZEIN E.M.E., CROWTHER J.R. & WILKINSON P.J. (1979). A solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of African swine fever antigen and antibody. *J. Hyg.*, **83**, 363–369.
30. ZSAK L., BORCA M.V., RISATTI G.R., ZSAK A., FRENCH R.A., LU Z., KUTISH G.F., NEILAN J.G., CALLAHAN J.D., NELSON W.M. & ROCK D.L. (1995). Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **43** (1), 112–119.

*

* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la peste porcine africaine (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).

RHINITE ATROPHIQUE DU PORC

RÉSUMÉ

Définition de la maladie : la rhinite atrophique est une maladie infectieuse du porc, caractérisée par un écoulement nasal séreux ou purulent, un raccourcissement et une torsion du groin, une atrophie osseuse des cornets nasaux et une baisse de productivité. Elle peut survenir sous une forme enzootique ou plus sporadique, en fonction de nombreux facteurs incluant l'immunité de l'élevage. La forme progressive, la plus sévère, est causée lors de l'infection par des souches toxigènes de *Pasteurella multocida* seules ou associées à *Bordetella bronchiseptica*. Les infections monovalentes à *B. bronchiseptica* peuvent provoquer une atrophie des cornets nasaux sous une forme modérée et non-progressive. L'atrophie des cornets nasaux peut n'être manifeste qu'à l'abattoir ou être détectée chez l'animal vivant, en utilisant la radiographie ou la tomographie. Les facteurs liés à l'environnement et à la conduite de l'élevage contribuent également à la sévérité et à l'incidence de cette maladie. Une forte proportion des élevages de porcs cliniquement sains peut être infectée par *B. bronchiseptica* ou par *P. multocida* non toxigène, et ne présenter qu'une atrophie modérée des cornets ou une faible prévalence.

Identification des agents pathogènes : le diagnostic de la rhinite atrophique tient compte des symptômes, des examens post mortem, ainsi que de l'isolement et de la caractérisation de *P. multocida* et de *B. bronchiseptica* chez les porcs concernés. L'isolement des deux micro-organismes est souvent rendu difficile par la présence d'autres bactéries à croissance plus rapide. Les taux d'isolement sont améliorés par la conservation des écouillons nasaux ou amygdaliens entre 4 et 8 °C dans un milieu de transport non nutritif et par l'utilisation d'un milieu de culture sélectif.

Pasteurella multocida et *B. bronchiseptica* peuvent être identifiées par des tests biochimiques classiques. Les isolats de *P. multocida* peuvent, en outre, être caractérisés par leurs antigènes capsulaires et somatiques. Le type capsulaire D est le plus répandu dans de nombreux pays dans le monde, cependant le type A domine dans certaines régions. Les antigènes capsulaires peuvent être distingués sérologiquement par l'hémagglutination indirecte ou l'immunofluorescence, chimiquement par floculation en présence d'acryflavine ou par la sensibilité à la hyaluronidase. Les types antigéniques somatiques peuvent être distingués par immunodiffusion en gélose, le type 3 étant celui qui est le plus fréquemment rencontré chez les porcs. Le caractère toxigène des isolats de *P. multocida* peut être démontré en évaluant la toxicité sur des cultures cellulaires. Un test immuno-enzymatique (ELISA) spécifique de la toxine est commercialisé et largement utilisé à travers le monde pour différencier les souches toxigènes des souches non-toxigènes. D'autre part, la détection d'une bactérie productrice de toxine peut être effectuée à partir de cultures cellulaires de première explantation, sans qu'il soit nécessaire d'isoler et d'identifier individuellement des colonies bactériennes.

Récemment, des épreuves fondées sur l'utilisation de sondes ADN ou sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été développées et permettent une détection rapide, sensible et hautement spécifique de *B. bronchiseptica* et de *P. multocida* (tant les souches toxigènes que les non toxigènes) par les laboratoires qui ont la possibilité de les utiliser. Une PCR multiplex pour le typage des antigènes capsulaires a également été décrit.

Épreuves sérologiques : la détection des anticorps dirigés contre *P. multocida* et *B. bronchiseptica* n'a que peu d'intérêt puisque d'une part, des réactions croisées peuvent être induites entre les antigènes des souches non-toxigènes de *P. multocida* et les antigènes des souches toxigènes et que d'autre part, *B. bronchiseptica* est présente dans de très nombreux élevages de porcs. Un test basé sur la détection des anticorps dirigés contre la toxine de

P. multocida est commercialisé mais son intérêt est limité dans la mesure où tous les porcs infectés ne développent pas d'anticorps. La vaccination, par *P. multocida* sous la forme de toxoïde, induit la synthèse d'anticorps, ce qui complique l'interprétation des résultats.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : plusieurs vaccins commerciaux sont disponibles et contiennent les bactérines de *B. bronchiseptica* et un mélange de souches toxigènes et/ou non-toxigènes de *P. multocida*, ou *P. multocida* sous forme de toxoïde ou sous une forme recombinante dans *Escherichia coli*.

A. INTRODUCTION

La rhinite atrophique est une maladie infectieuse du porc. Les signes cliniques précoces sont des éternuements, du reniflement et du larmolement qui aboutit à un écoulement de larmes foncées et un écoulement nasal qui varie de séreux à mucopurulent ; dans certains cas, on peut noter de l'épistaxis. L'atrophie osseuse des cornets et une déviation de la cloison nasale entraînent un raccourcissement et une torsion du groin et, dans les cas graves, une difficulté à se nourrir. Deux formes ont été rapportées (9) :

- a) Une forme sévère et progressive causée par les souches toxigènes de *Pasteurella multocida*, le plus fréquemment les types capsulaires A et D, seules ou en association avec *Bordetella bronchiseptica*.
- b) Une forme moins sévère avec une atrophie modérée des cornets nasaux, souvent sans modification significative du groin, causée par *B. bronchiseptica*.

L'augmentation de la sévérité est associée à une concentration excessive des animaux et de mauvaises conditions de logement et d'environnement. Une productivité réduite est généralement associée à une forme modérée à sévère de rhinite atrophique, sans qu'une relation précise n'ait été établie entre l'infection par ces bactéries et la réduction pondérale des animaux. *B. bronchiseptica* et les souches toxigènes de *P. multocida* sont fréquemment isolées chez de nombreuses espèces animales, domestiques et sauvages, ce qui pourrait exacerber la transmission de la bactérie à des élevages de porcs.

Bordetella bronchiseptica ou les souches toxigènes de *P. multocida* peuvent être présentes dans un élevage, sans manifestation clinique de la maladie, en particulier lorsque d'autres agents pathogènes respiratoires sont absents et lorsque les conditions d'environnement et de conduite d'élevage sont optimales. De tels élevages, porteurs asymptomatiques, constituent un risque de transmission de ces agents à d'autres élevages, au sein desquels la maladie peut survenir sous une forme sévère.

Le diagnostic de la rhinite atrophique se fonde sur les signes cliniques, l'anatomopathologie et les résultats microbiologiques, ces derniers revêtant une importance capitale pour les élevages concernés par une infection subclinique. Il est généralement admis qu'un élevage, dont les animaux hébergent une souche toxigène de *P. multocida*, est atteint de rhinite atrophique progressive, que les signes cliniques de la maladie soient, ou non, présents (26). Ainsi, dans de nombreux pays, le contrôle est axé sur la détection de l'infection, même si les animaux asymptomatiques sont considérés comme des porteurs potentiels.

L'atrophie des cornets nasaux peut n'être observée qu'à l'abattoir, lors de l'examen des sections de groins, effectuées au niveau des premières ou secondes prémolaires supérieures. L'évaluation subjective de l'atrophie des cornets nasaux est pratique et souvent utile pour gérer les élevages (9), mais des échelles de mesures objectives ont également été décrites (16) et sont plus adaptées aux études exigeant des résultats d'analyses. La radiographie (12) et la tomographie (24) sont également utilisées pour détecter les lésions chez l'animal vivant ; la tomographie ne révèle pas seulement les lésions graves, mais aussi des changements légers qui peuvent ne pas apparaître à la radiographie. Cependant, ces techniques sont d'usage limité en raison de l'équipement et de l'expérience nécessaires. Le diagnostic est facilité par la détection des changements histopathologiques incluant un remplacement fibreux des cloisons osseuses de la volute ventrale avec divers degrés d'inflammation et de remaniements.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification des agents pathogènes

a) Culture

Pasteurella multocida colonise préférentiellement les amygdales ; ainsi les écouvillonnages ou les biopsies d'amygdales fournissent-ils le taux d'isolement le plus élevé (1). Les écouvillonnages nasaux sont

préférables pour l'isolement de *B. bronchiseptica*. Dans le cas où les prélèvements d'amygdales ne sont pas réalisables, l'écouvillonnage des cavités nasales suffit à l'isolement des deux micro-organismes. Les écouvillonnages doivent être réalisés avec des écouvillons à tige flexible ; chez les porcelets, les prélèvements seront plus facilement réalisés avec des mini-écouvillons. Un simple écouvillon permet de réaliser les prélèvements au niveau des cavités nasales, à gauche et à droite, il est ensuite placé dans un milieu de transport non-nutritif (un tampon phosphate) et gardé entre 4 et 8 °C pendant le transport, afin d'éviter le développement d'autres bactéries à croissance plus rapide. Le temps du transport ne doit pas excéder 24 h.

Bien que *P. multocida* et *B. bronchiseptica* se multiplient facilement sur une gélose au sang, un milieu sélectif est cependant préférable afin de limiter l'envahissement par d'autres bactéries, présentes en plus grand nombre, qui interfèrent souvent avec leur détection. Une autre difficulté apparaît, liée à *B. bronchiseptica* dont la croissance est plus lente que celle de la plupart des autres bactéries présentes dans les échantillons issus d'examen cliniques. Des milieux, aux formules variées, contenant des antibiotiques sont utilisés pour l'isolement de *P. multocida*, mais la comparaison des études rapportées dans la littérature montrent que le taux d'isolement le plus élevé est obtenu avec le milieu modifié de Knight (gélose au sang de bovin, contenant 5 µg/ml de clindamycine, 0,75 µg/ml de gentamycine) (22) ou KPMD (gélose au sang de bovin contenant 3,75 U/ml de bacitracine, 5 µg/ml de clindamycine, 0,75 µg/ml de gentamycine et 2,25 µg/ml d'amphotéricine B) (1). La gélose de MacConkey avec 1 % de glucose et 20 µg/ml de furaltadone est utilisée par de nombreux laboratoires, comme milieu sélectif pour l'isolement de *B. bronchiseptica*, à partir d'écouvillonnages nasaux, mais le milieu de Smith-Baskerville modifié (une gélose peptone contenant 20 µg/ml de pénicilline, 20 µg/ml de furaltadone et 0,5 µg/ml de gentamycine) semble supérieur, en particulier quand le nombre de *B. bronchiseptica* présentes est faible (22, 35). Une amélioration supplémentaire du taux d'isolement a été rapportée par l'utilisation d'une gélose au sang contenant 40 µg/ml de céphalexine (22). Une gélose au sang sélective pour l'isolement simultané de *P. multocida* et *B. bronchiseptica*, contenant 5 mg/litre de clindamycine-HCl, 0,75 mg/litre de gentamycine sulfate, 2,5 mg/litre de tellurite de potassium, 5 mg/litre d'amphotéricine-B et 15 mg/litre de bacitracine, a aussi été décrite (10). Cependant, il faut prendre garde au fait que le tellurite de potassium a parfois entraîné une inhibition de la croissance de *P. multocida* de type D (22).

b) Caractéristiques biochimiques

P. multocida est une bactérie à Gram négatif, bipolaire, bacilliforme, douée de pléomorphisme, non hémolytique, se présentant sous forme de colonies grisâtres sur gélose au sang avec une odeur douceâtre caractéristique (29). Cette bactérie ne se développe pas sur une gélose de MacConkey, possède une catalase et une oxydase et produit de l'indole.

B. bronchiseptica est également une bactérie à Gram négatif, bacilliforme, formant des colonies convexes de 1-2 mm de diamètre, généralement hémolytique sur une gélose au sang ou un milieu de Bordet-Gengou, après 48 h d'incubation (30). Elle ne fermente pas les sucres, mais possède une oxydase, une catalase, utilise le citrate et l'urée et se multiplie en présence de 6,5 % de NaCl.

Les tests d'agglutination, utilisant des anticorps spécifiques ont été décrits pour confirmer l'identité présumée d'un isolat de *B. bronchiseptica*, mais les sérums appropriés ne sont pas largement disponibles pour cet usage.

• Typage capsulaire de *Pasteurella multocida*

Le typage capsulaire de *P. multocida* est utile dans le cadre d'objectifs épidémiologiques. La sérotypie par hémagglutination indirecte a traditionnellement été utilisée (3), mais très peu de laboratoires dans le monde produisent et entretiennent les antisérums nécessaires. Cependant, des méthodes chimiques plus simples peuvent en principe distinguer la plupart des souches d'origine porcine. Celles qui correspondent au type capsulaire D flocculent abondamment en présence d'une solution aqueuse d'acriavine au 1/1 000 (5), alors que les souches de type capsulaire A peuvent être identifiées par inhibition de la croissance en présence de hyaluronidase (4). Une faible proportion des souches d'origine porcine est non-capsulée.

• Protocole d'utilisation du test à l'acriavine pour les souches de *Pasteurella multocida* de type capsulaire D

- i) Ensemencer un tube contenant 3 ml de bouillon cœur-cerveau (BHI), en utilisant une culture fraîche, récoltée sur une gélose au sang de bovin, pour chacune des souches de *P. multocida* faisant l'objet d'une analyse. Inclure une souche connue de type D et une souche connue de type A, comme témoins positif et négatif ;
- ii) Incuber les tubes ensemencés à 37 °C pendant 18 à 24 h ;
- iii) Sédimer les bactéries par centrifugation et éliminer 2,5 ml de surnageant ;

- iv) Ajouter 0,5 ml d'une solution aqueuse d'acriflavine neutre au 1/1 000. La solution d'acriflavine doit être renouvelée chaque semaine et stockée à 4 °C, à l'abri de la lumière ;
- v) Mélanger, afin de remettre le culot bactérien en suspension et incuber le tube à la température de la pièce, sans agiter ;
- vi) Observer la présence d'un important précipité floconneux, après 5 min.

- **Protocole d'utilisation du test à la hyaluronidase pour les souches de *Pasteurella multocida* de type capsulaire A**

- i) Préparer des cultures fraîches des isolats à analyser, sur gélose au sang de bovin. Inclure une souche connue de type A et une souche connue de type D, comme témoins positif et négatif ;
- ii) Ensemencer, séparément, chacune des souches faisant l'objet d'un examen, sur boîte de gélose à la trypticase-soja contenant 6 % de sang de bovin, par la méthode des stries parallèles séparées par 3 à 5 mm, en utilisant tout le diamètre de la boîte. Pour une production maximale d'acide hyaluronique, il est important que les boîtes de gélose soient fraîches et non déshydratées ;
- iii) Effectuer l'ensemencement d'une souche de *Staphylococcus aureus* productrice de hyaluronidase, par une large strie perpendiculaire à la culture de *P. multocida* ;
- iv) Incuber les boîtes de gélose à 37 °C, en atmosphère humide, en les observant régulièrement jusqu'à 24 h. Les souches de type capsulaire A montreront une inhibition nette de la croissance dans la région adjacente à la zone de croissance de *Staphylococcus aureus* ;

- **Typage de l'antigène somatique de *Pasteurella multocida***

Le typage de l'antigène somatique est basé sur les variations du lipopolysaccharide de la paroi des souches de *P. multocida*. Seize types peuvent être distingués par immunodiffusion en gélose (18), le type 3 étant le plus fréquemment rencontré chez les porcs. Bien que les antisérums nécessaires ne soient pas disponibles aisément, beaucoup de laboratoires de références et quelques laboratoires de diagnostic réalisent le typage de l'antigène somatique.

- **Détection des toxines de *Pasteurella multocida***

Le diagnostic de la rhinite atrophique progressive dépend de la détection du caractère toxigène des souches de *P. multocida*. La toxine thermolabile de *P. multocida* produit une dermonécrose chez le cobaye, elle est létale pour la souris après une injection intrapéritonéale. Le caractère toxigène peut également être mis en évidence *in vitro* en évaluant l'effet cytopathogène sur des cultures de cellules embryonnaires de poumons de bovin (34), sur des cellules de rein de singe vert d'Afrique (cellules Vero) (28) ou des cellules bovines de cornets (13). Les bactéries sont cultivées en bouillon cœur-cerveau (BHI), incubées à 37 °C pendant 24 h puis récoltées par centrifugation. Le surnageant est stérilisé par filtration et titré sur cultures cellulaires préparées en microplaques. Après une incubation à 37 °C, pendant 2 à 3 jours, les cellules en monocouche sont colorées au crystal violet, puis examinées en microscopie optique afin de détecter les effets cytopathogènes. Un test rapide sur cultures cellulaires, dans lequel les colonies suspectes sont cultivées sur une gélose recouverte de cellules embryonnaires de poumons de bovins (6), permet une analyse plus efficace d'un grand nombre de souches.

Un test immuno-enzymatique (ELISA), utilisant des anticorps monoclonaux peut détecter la toxine dans un mélange de bactéries isolées à partir d'un milieu d'isolement primaire (14). Ceci représente un sérieux avantage, car le porc peut être infecté simultanément par un mélange de souches toxigènes et non toxigènes (1, 9). Les méthodes utilisant les cultures cellulaires exigeraient pour atteindre le niveau de sensibilité de l'ELISA que chacune des colonies de *P. multocida* issues de l'échantillon soient testées, ce qui n'est pas possible en pratique.

Ce test ELISA est disponible et commercialisé en Europe et dans quelques autres régions du monde¹ (mais pas aux États-Unis d'Amérique), il est largement utilisé dans de nombreuses régions et privilégié pour la détection des animaux porteurs et le contrôle de la rhinite atrophique progressive. Bien que très spécifique, un résultat positif sans un épisode antérieur de la maladie, ou sans symptômes suspects doit être parfaitement investigué afin de détecter les souches toxigènes à partir des échantillons provenant des animaux.

1 Disponible auprès du laboratoire DakoCytomation Denmark A/S, Produktionsvej 42, DK-2600 Glostrup, Danemark; <http://www.dakocytomation.com..>

c) Méthodes d'identification des acides nucléiques

La morphologie des colonies et les tests biochimiques constituent, dans de nombreux laboratoires, la base pour l'identification des souches de *P. multocida* toxigènes et des souches de *B. bronchiseptica*. Cependant, un certain nombre de tests récemment décrits, fondés sur l'utilisation des sondes ADN (20, 32) ou sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) (19, 23, 25, 31) pour la détection des souches toxigènes de *P. multocida* et des souches de *B. bronchiseptica* isolées chez le porc, se révèlent être des outils de diagnostic prometteurs, de par leur plus grande rapidité, sensibilité et spécificité. Les laboratoires de diagnostic utilisent de plus en plus la PCR pour l'identification des ces agents pathogènes depuis que le matériel et l'expertise se sont généralisés. Une validation appropriée réalisée par le laboratoire grâce à des témoins connus et normalisés est indispensable, ainsi qu'une procédure de contrôle de qualité (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*).

Un test PCR multiplexe pour le typage capsulaire de *P. multocida*, qui semble apporter des résultats plus fiables que les méthodes phénotypiques, a été récemment décrit (37) et pourrait se révéler utile dans les laboratoires correctement équipés.

Diverses techniques d'analyse de profil de migrations en gel de l'ADN (DNA fingerprinting) y compris l'analyse par les endonucléases de restriction (*Restriction endonuclease analysis* = REA), le typage ribonucléique, l'électrophorèse en champs pulsés et des méthodes basées sur la PCR ont été évaluées par plusieurs groupes avec comme objectif la différenciation des isolats de *P. multocida*. Peu d'études comparatives entre les méthodes ont été réalisées avec des souches provenant de porcs atteints de rhinite atrophique, mais la REA semble être la méthode de choix pour les enquêtes épidémiologiques car elle autorise un haut niveau de discrimination sans équipements ni réactifs spécialisés (11, 15, 17).

2. Épreuves sérologiques

Actuellement, il n'existe pas d'épreuves sérologiques satisfaisantes qui puissent détecter d'une manière fiable les animaux infectés par des souches de *P. multocida* toxigènes et capables de développer ou de transmettre la maladie. La détection des anticorps dirigés contre *P. multocida* n'est pas utile, car les souches non-toxigéniques possèdent des antigènes entraînant de nombreuses réactions croisées avec les souches toxigéniques. Un ELISA pour la détection des anticorps dirigés contre la toxine de *P. multocida* a été décrit (14), il est disponible et commercialisé en Europe et dans quelques autres régions du monde (voir la note de bas de page n°1). Cependant, de nombreux animaux infectés par *P. multocida* toxigénique ne produisent pas d'anticorps contre la toxine, et la très large utilisation des vaccins sous forme de toxoïde limite la valeur diagnostique de cet ELISA aux élevages sans historique de vaccination ou à la détection d'une réponse vaccinale dans les élevages vaccinés.

L'infection à *B. bronchiseptica* peut être sérologiquement détectée par un test d'agglutination avec des bactéries traitées par le formol ou par un test ELISA plus sensible (38). À moins qu'il s'agisse de contrôler le statut d'un élevage négatif, la sérologie *B. bronchiseptica* n'a que peu de valeur puisque la bactérie est présente dans de nombreux élevages apparemment sains.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il existe plusieurs vaccins commerciaux disponibles qui contiennent des cellules entières sous forme de bactérines de *B. bronchiseptica* ainsi qu'un mélange de souches toxigénique et non-toxigénique de *P. multocida*, ou *P. multocida* sous forme de toxoïde. Des vaccins vivants ou atténués, destinés à prévenir l'infection à *B. bronchiseptica* sont également disponibles. Les vaccins contenant uniquement *B. bronchiseptica* ne conviennent pas pour contrôler la rhinite atrophique, mais peuvent présenter un avantage dans les élevages concernés par une forme non progressive de la maladie. Les vaccins contre *P. multocida* et *B. bronchiseptica* semblent réduire le niveau de colonisation par ces bactéries, mais ne peuvent ni les éliminer ni diminuer l'infection.

La toxine de *P. multocida* est un antigène simple et le plus protecteur dans le cadre de la rhinite atrophique progressive. Les vaccins fondés sur une forme toxoïde de *P. multocida* induisent une protection spécifique contre l'action de la toxine, qui, par elle-même, peut être utilisée pour produire l'ensemble des manifestations majeures de cette maladie (voir la réf. 14 de la bibliographie). Le taux de toxine produite par *P. multocida* est relativement faible et la réponse, en anticorps spécifiques de la toxine, induite par les vaccins sous forme de bactérines seules, peut ne pas être optimale. La difficulté et les dépenses engendrées par une purification à grande échelle ne permettent pas l'incorporation en routine de toxoïde purifié dans les vaccins. Des études de terrain ont montré qu'un dérivé de la toxine recombinante de *P. multocida*, dans lequel manque un segment de la portion de l'extrémité aminée de la protéine, était non toxique, mais immunogène et d'une efficacité supérieure chez le porc.

(2, 27). Plus récemment, une forme toxoïde recombinante complète dans laquelle deux acides aminés ont été substitués (ce qui supprime le pouvoir toxigène) s'est aussi révélée très efficace (36). Il a été démontré qu'un vaccin ADN codant une forme toxoïde complète, mais inactive au plan enzymatique, était hautement immunogène chez les porcs, mais son efficacité n'a pas, pour l'instant, été évaluée par épreuve virulente (33).

Bordetella bronchiseptica produit une variété de toxines et d'adhésines qui sont des facteurs de virulence potentiels pour le porc. Seule la pertactine, une protéine de la membrane externe, s'est montrée capable de protéger le porc contre la maladie (21). En dépit de ce fait, une toxine dermonécrosante produite par *B. bronchiseptica*, unique pour la toxine produite par *P. multocida*, a traditionnellement été considérée comme le facteur de virulence primaire et l'immunogène produisant une protection chez le porc (9). De nombreuses études impliquent fortement la toxine comme facteur de virulence et son rôle sans équivoque dans la pathogénie, voire dans la protection. Cependant, le rôle de la pertactine dans la protection ainsi que celui de plusieurs autres facteurs de virulence sont vraisemblablement aussi importants voire supérieurs à celui de la toxine.

Bordetella bronchiseptica est sujette à des variations phénotypiques dans certaines conditions de culture (ex, températures au-dessous de 37 °C ou la présence de médiateurs chimiques comme MgSO₄ ou l'acide nicotinique), dans lesquelles la production de la plupart des facteurs de virulence est stoppée d'une manière réversible. Des mutants apparaissent spontanément, définitivement incapables de produire la plupart des facteurs de virulence, et à faible fréquence pendant la culture. En examinant soigneusement la morphologie des colonies, dans une zone de la boîte présentant des colonies bien isolées, il est essentiel de choisir les cultures en phase I (également connues sous le nom de Bvg⁺), la forme virulente. Les colonies en phase I sont petites (1 à 2 mm de diamètre), bombées, hémolytiques sur gélose au sang. La perte de l'hémolyse et l'apparition de colonies plus grandes et plates indiquent le passage à la forme non-virulente. À chaque fois que cela est possible, les cultures doivent être multipliées en utilisant des colonies isolées et hémolytiques, afin de réduire l'accumulation de clones avirulents dans la population bactérienne.

Les valeurs de référence et les détails précis concernant la production de vaccins commerciaux et efficaces ne sont pas disponibles, mais on sait qu'ils contiennent 10¹⁰ cellules formolées-tuées de *B. bronchiseptica* et 10 µg de *P. multocida* sous forme de toxoïde, par dose. Il est également établi que la forme toxoïde purifiée (inactivée par le formol) est plus immunogène que la toxine brute, et que l'immunogénicité de la forme inactivée n'est pas affectée par l'association à une bactérine de *B. bronchiseptica*. La toxine de *P. multocida*, sous sa forme recombinante tronquée, a été inactivée par délétion d'une portion du gène, ce qui ne semble pas compromettre l'immunogénicité et le rôle protecteur. Tous les vaccins commerciaux disponibles contiennent soit un adjuvant huileux soit un gel d'hydroxyde d'aluminium.

Bordetella bronchiseptica, utilisée dans la production des vaccins doit se trouver sous la forme d'une culture virulente en phase I et les isolats de *P. multocida* doivent être toxigènes. L'identification des semences de *B. bronchiseptica* et de *P. multocida* ainsi que l'historique des passages doivent être documentés par les moyens conventionnels. Un nombre défini de passages est retenu pour la production de la culture. *Bordetella bronchiseptica* doit être inactivée par le formol. La toxine de *P. multocida* étant intracellulaire et produite par la lyse cellulaire pendant la phase stationnaire, le surnageant de culture doit être récolté approximativement 48 h après la fin de la phase exponentielle de croissance.

1. Gestion des semences bactériennes

a) Caractéristiques de la semence bactérienne

Le système des lots de semence doit être employé pour les souches bactériennes utilisées pour préparer les cellules entières sous forme de bactérines, ainsi que pour les souches à partir desquelles les antigènes purifiés sont dérivés.

Dans le cas des cellules entières sous forme de bactérines, l'origine et l'historique des souches de *P. multocida* et de *B. bronchiseptica* doivent être décrits et la caractérisation complète des lots de semence doit être établie dans le protocole de production d'un lot de semence primaire.

Les semences utilisées pour une production de vaccin doivent dériver du lot de semence et doivent être contrôlées vis-à-vis de toutes les propriétés essentielles, ainsi que le décrit le protocole de production d'un lot de semence primaire.

b) Méthode de culture

Toutes les souches bactériennes doivent être cultivées en milieu adéquat permettant d'obtenir une culture satisfaisante, ainsi que l'expression des antigènes importants.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

i) Pureté

Le lot de semences primaires, ainsi que les semences de production doivent être des cultures pures, indemnes de contaminations par des bactéries, des champignons, des mycoplasmes et des virus.

L'identification des espèces bactériennes et la production des antigènes essentiels doivent être confirmées.

ii) Innocuité

Bien que l'inactivation des cultures bactériennes par une méthode validée soit une procédure normalisée, pour les deux espèces bactériennes qui produisent des toxines dermonécrosantes, la détoxification de ces toxines doit être confirmée lorsque les toxoïdes sont utilisées comme composants de vaccins. Des contrôles d'innocuité par des tests normalisés, utilisés pour les vaccins inactivés, doivent être conduits (7, 8).

iii) Efficacité

L'efficacité d'une épreuve vaccinale doit être mesurée par la vaccination de lots de truies gestantes. Les porcelets qui en sont issus doivent être infectés expérimentalement par des cultures de *B. bronchiseptica* virulentes et de *P. multocida* toxigènes. Une protection significative doit être obtenue, vis-à-vis des signes cliniques de la forme progressive de la rhinite atrophique, ex : atrophie des cornets nasaux. Les signes cliniques induits chez les animaux témoins et chez les animaux vaccinés doivent être comparés selon l'échelle des scores établie par Done (12).

2. Méthode de fabrication

Les cultures de *B. bronchiseptica* et de *P. multocida* doivent être multipliées séparément sur un milieu permettant une culture satisfaisante et une expression optimale des antigènes nécessaires à la production des anticorps protecteurs. *Bordetella bronchiseptica* doit être confirmée en phase I de culture et, pour *P. multocida*, il est nécessaire de confirmer la production de la toxine, à un taux suffisant.

Les cellules de *B. bronchiseptica*, et celles de *P. multocida* et/ou la toxine, sont inactivées, détoxifiées et associées à un adjuvant. Les adjuvants courants sont des sels d'aluminium ou des émulsions huileuses.

3. Contrôles en cours de fabrication

Pendant le processus industriel, les contrôles suivants doivent être entrepris :

a) Pureté et identification des cultures de semences

Les cultures sontensemencées sur une gélose au sang puis incubées. Aucune colonie non spécifique ne doit se développer sur ces boîtes.

b) Pureté et identification des cultures de production

Les cultures sontensemencées sur une gélose au sang puis incubées. Aucune colonie non spécifique ne doit se développer sur ces boîtes.

c) Inactivation des cultures avant les traitements ultérieurs

Les cultures sont inactivées par le formol. Des tests sont réalisés afin de contrôler l'efficacité du processus d'inactivation et d'évaluer le formol résiduel.

d) Quantification des antigènes

Ceci est effectué par un comptage cellulaire global, en utilisant une enceinte de comptage des bactéries, par la numération des cellules entières ou par la détermination des antigènes définis, ex : la toxine de *P. multocida* par une épreuve immuno-enzymatique.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Chaque lot de vaccin doit être testé pour sa stérilité selon un protocole normalisé (voir Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ») décrit par la Commission Européenne de la Pharmacopée ou par le code de réglementation fédéral des États-Unis d'Amérique.

b) Innocuité

Chaque lot de vaccin doit être testé pour son innocuité chez l'espèce animale cible, en donnant une double dose par la voie de vaccination recommandée, et dans un deuxième temps, une simple dose, 2 semaines plus tard. Aucune réaction locale ou systémique anormale ne doit apparaître.

c) Activité

Chaque lot de vaccin doit être évalué pour son activité en utilisant une épreuve sérologique validée, en corrélation avec la protection obtenue dans l'essai d'efficacité, comme décrit dans la section C.1.c.iii. Le test d'activité n'est pas nécessairement conduit chez l'espèce animale cible – souris ou lapins peuvent être utilisés. Dans ces derniers cas, une corrélation avec le taux des anticorps protecteurs chez l'animal cible doit être démontrée.

d) Durée de l'immunité

Normalement, le vaccin est utilisé dans la dernière phase de la gestation, ainsi les porcelets seront-ils protégés par les anticorps d'origine colostrale.

Lorsque la vaccination est appliquée sans tenir compte du stade de la gestation, la durée de l'immunité devrait être de 6 mois au moins, aussi les rappels de vaccination 2 fois par an devraient-ils maintenir les taux d'anticorps protecteurs.

e) Stabilité

Chaque lot de vaccin doit faire l'objet d'un test de durée de vie accélérée, qui doit être corrélée avec l'épreuve de durée de vie en temps réel.

f) Agents de conservation

Lorsqu'un agent de conservation est utilisé, la concentration doit être mesurée pour chaque lot. Il ne doit pas excéder le niveau maximal autorisé.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Lorsqu'une émulsion huileuse est utilisée comme adjuvant, l'injection accidentelle peut provoquer une réaction locale chez l'opérateur. Un examen médical doit être immédiatement pratiqué, effectuer une aspiration au niveau de la blessure à l'aide d'une pompe.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Chaque lot de vaccin doit être testé pour son innocuité, comme décrit dans la section C.4.b.

b) Activité

Chaque lot de vaccin doit être testé pour son activité, comme décrit dans la section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ACKERMANN M.R., DEBEY M.C., REGISTER K.B., LARSON D.J. & KINYON J.M. (1994). Tonsil and turbinate colonization by toxigenic and nontoxigenic strains of *Pasteurella multocida* in conventionally raised swine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 375–377.

2. BORDING A., NYMARK K. & SMIDT E. (1994). Field trials with a new genetically engineered vaccine for protection against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Acta Vet. Scand.*, **35**, 155–163.
3. 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.
4. CARTER G.R. & RUNDELL S.W. (1975). Identification of type A strains of *P. multocida* using staphylococcal hyaluronidase. *Vet. Rec.*, **96**, 343.
5. CARTER G.R. & SUBRANTO P. (1973). Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. *Am. J. Vet. Res.*, **34**, 293–294.
6. CHANTER N., RUTTER J.M. & LUTHER P.D. (1986). Rapid detection of toxigenic *Pasteurella multocida* by an agar overlay method. *Vet. Rec.*, **119**, 629–630.
7. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (1992). Commission Directive 92/18/EEC of the 20th March 1992 modifying the annex to Council Directive 81/852/EEC on the approximation of the laws of member states relating to analytical, pharmotoxicological and clinical standards and protocols in respect of the testing of veterinary medical products. *Off. J. European Communities*.
8. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (1994). CVMP Working Party on the Efficacy of Veterinary Medicines. Note for Guidance. Rue de la Loi 200, B-1049, Brussels, Belgium.
9. DE JONG M.F. (2006). In: Diseases of Swine, Ninth Edition, Straw B.E., Zimmerman J.J., d'Allaire S. & Taylor D.J., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 577–602.
10. DE JONG M.F. & BORST G.H. (1985). Selective medium for the isolation of *P. multocida* and *B. bronchiseptica*. *Vet. Rec.*, **116**, 167.
11. DJORDJEVIC S.P., EAMENS G.J., HA H., WALKER M.J. & CHIN J.C. (1998). Demonstration that Australian *Pasteurella multocida* isolates from sporadic outbreaks of porcine pneumonia are non-toxigenic (tox^A-) and display heterogeneous DNA restriction endonuclease profiles compared with toxigenic isolates from herds with progressive atrophic rhinitis. *J. Med. Microbiol.*, **47**, 679–688.
12. DONE J.T. (1976). Porcine atrophic rhinitis: snout radiography as an aid to diagnosis and detection of the disease. *Vet. Rec.*, **98**, 23–28.
13. EAMENS G.J., KIRKLAND P.D., TURNER M.J., GARDNER I.A., WHITE M.P. & HORNITZKY C.L. (1988). Identification of toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs by in vitro characterisation. *Aust. Vet. J.*, **65**, 120–123.
14. FOGED N.T. (1992). *Pasteurella multocida* toxin. The characterisation of the toxin and its significance in the diagnosis and prevention of progressive atrophic rhinitis in pigs. *APMIS Suppl.*, **25**, 1–56.
15. GARDNER I.A., KASTEN R., EAMENS G.J., SNIPES K.P. & ANDERSON R.J. (1994). Molecular fingerprinting of *Pasteurella multocida* associated with progressive atrophic rhinitis in swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 442–447.
16. GATLIN C.L., JORDAN W.H., SHRYOCK T.R. & SMITH W.C. (1996). The quantitation of turbinate atrophy in pigs to measure the severity of induced atrophic rhinitis. *Can. J. Vet. Res.*, **60**, 121–126.
17. HAREL J., CÔTÉ S. & JACQUES M. (1990). Restriction endonuclease analysis of porcine *Pasteurella multocida* isolates from Quebec. *Can. J. Vet. Res.*, **54**, 422–426.
18. HEDDLESTON K.L., GALLAGHER J.E. & REBERS P.A. (1972). Fowl cholera: gel diffusion precipitation test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.*, **16**, 925–936.
19. KAMP E.M., BOKKEN G.C., VERMEULEN T.M., DE JONG M.F., BUYS H.E., REEK F.H. & SMITS M.A. (1996). A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 304–309.
20. KAMPS A.M., BUYS W.E., KAMP E.M. & SMITS M.A. (1990). Specificity of DNA probes for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* strains. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 1858–1861.

21. KOBISCH M. & NOVOTNY P. (1990). Identification of a 68 kilodalton outer membrane protein as the major protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific-pathogen-free piglets. *Infect. Immun.*, **58**, 352–357.
22. LARIVIERE S., LEBLANC L., MITTAL K.R. & MARTINEAU G.P. (1993). Comparison of isolation methods for the recovery of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from the nasal cavities of piglets. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 364–367.
23. LICHTENSTEIGER C.A., STEENBERGEN S.M., LEE R.M., POLSON D.D. & VIMR E.R. (1996). Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 3035–3039.
24. MAGYAR T., KOVÁCS F., DONKÓ T., BIRÓ H., ROMVÁRI R., KOVÁCS M. & REPA I. (2003). Turbinate atrophy evaluation in pigs by computed tomography. *Acta Vet. Hung.*, **51**, 485–491.
25. NAGAI S., SOMENO S. & YAGIHASHI T. (1994). Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1004–1010.
26. PEDERSEN K.B., NIELSEN J.P., FOGED N.T., ELLING F., NIELSEN N.C. & WILLEBERG P. (1988). Atrophic rhinitis in pigs: proposal for a revised definition. *Vet. Rec.*, **122**, 190–191.
27. PEJSAK Z., WASIŃSKA B., MARKOWSKA-DANIEL I. & HOGG A. (1994). Field evaluation of thirteen regimens for the control of progressive atrophic rhinitis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **17**, 125–132.
28. PENNINGS A.M. & STORM P.K. (1984). A test in vero cell monolayers for toxin production by strains of *Pasteurella multocida* isolated from pigs suspected of having atrophic rhinitis. *Vet. Microbiol.*, **9**, 503–508.
29. QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B. & CARTER G.R. (1994). *Pasteurella* species. In: Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, London, United Kingdom, 254–258.
30. QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B. & CARTER G.R. (1994). *Bordetella* species. In: Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, London, United Kingdom, 280–283.
31. REGISTER K.B. & DEJONG K.D. (2006). Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. *Vet. Microbiol.*, **117**, 201–210.
32. REGISTER K.B., LEE R.M. & THOMSON C. (1998). Two-color hybridization assay for simultaneous detection of *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* from swine. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3342–3346.
33. REGISTER K.B., SACCO R.E. & BROCKMEIER S.L. (2007). Immune response in mice and swine to DNA vaccines derived from the *Pasteurella multocida* toxin gene. *Vaccine*, **25**, 6118–6128.
34. RUTTER J.M. & LUTHER P.D. (1984). Cell culture assay for toxigenic *Pasteurella multocida* from atrophic rhinitis of pigs. *Vet. Rec.*, **114**, 393–396.
35. SMITH I.M. & BASKERVILLE A.J. (1979). A selective medium facilitating the isolation and recognition of *Bordetella bronchiseptica* in pigs. *Res. Vet. Sci.*, **27**, 187–192.
36. TO H., SOMENO S. & NAGAI S. (2005). Development of a genetically modified nontoxigenic *Pasteurella multocida* toxin as a candidate for use in vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, **66**, 113–118.
37. TOWNSEND K.M., BOYCE J.D., CHUNG J.Y., FROST A.J. & ADLER B. (2001). Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 924–929.
38. VENIER L., ROTHSCHILD M.F. & WARNER C.M. (1984). Measurement of serum antibody in swine vaccinated with *Bordetella bronchiseptica*: comparison of agglutination and enzyme-linked immunosorbent assay methods. *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 2634–2636.

*
* *

PESTE PORCINE CLASSIQUE (hog cholera)

RÉSUMÉ

La peste porcine classique (PPC), aussi connue sous la dénomination de hog cholera, est une maladie virale contagieuse du porc. Le virus responsable est un membre du genre Pestivirus de la famille des Flaviviridae, et se révèle très proche des virus de la maladie des muqueuses et de la maladie de la frontière (Border disease). Il n'existe qu'un sérotype de virus PPC.

La maladie peut évoluer sous forme aiguë, chronique, latente, ou inapparente selon divers facteurs tenant au virus ou à l'hôte, parmi eux l'âge de l'animal, la virulence de la souche virale et la période d'infection (pré- ou post-natale) jouent un rôle prépondérant. Les porcs adultes sont moins sévèrement atteints que les jeunes et ont de meilleures chances de survie. Chez les truies gestantes, le virus peut traverser la barrière placentaire et atteindre les fœtus. L'infection in utero par des souches virales de basse ou faible virulence peut aboutir à ce que l'on a appelé le syndrome de la « la truie porteuse », entraînant une mortalité pré-natale ou post-natale précoce, la naissance de porcelets malades ou d'une portée en apparence bonne santé mais infectée de façon persistante. Une épizootie de PPC a des répercussions lourdes sur le commerce des porcs et de leurs produits.

Le tableau clinique très polymorphe de la PPC interdit le plus souvent la réalisation d'un diagnostic purement clinique ou lésionnel. Les méthodes de laboratoire sont alors essentielles pour un diagnostic précis. La mise en évidence du virus ou de l'acide nucléique dans le sang et des anticorps dans le sérum, constituent les méthodes de choix du diagnostic de la PPC chez le porc vivant, tandis que la recherche du virus, de l'acide nucléique ou de l'antigène dans des prélèvements d'organes, est de loin préférable quand le porc est mort.

Identification de l'agent pathogène : *l'immunofluorescence (IF) appliquée sur des coupes au cryostat d'organes provenant de porcs atteints, peut être utilisée pour la détection de l'antigène PPC. Une série d'anticorps monoclonaux (AcMs) est utilisée pour déterminer si la fluorescence est due à des antigènes pestivirus PPC ou non PPC. L'amplification en chaîne par polymérase (PCR) est utilisée couramment pour la détection du génome du virus de la PPC. L'isolement du virus PPC peut être tenté sur la lignée cellulaire de rein de porc (PK-15) ou sur une autre lignée sensible. La production virale en culture de cellules est recherchée par coloration en immunofluorescence ou immunoperoxydase ; les isolats positifs sont ensuite caractérisés grâce aux AcMs et par un séquençage génétique partiel. Les protocoles de PCR pour l'identification de l'acide nucléique du virus PPC sont acceptés au niveau international et sont utilisés dans plusieurs laboratoires tant pour la détection du virus que pour le différencier des pestivirus des ruminants. Des épreuves immuno-enzymatiques de capture d'antigène (ELISA) sont aussi très utiles pour le dépistage des élevages mais ne doivent pas être utilisées pour le diagnostic d'un animal isolé.*

Épreuves sérologiques : *la recherche des anticorps spécifiques du virus est particulièrement utile dans les élevages suspectés d'être infectés depuis au moins 21 jours, par le virus de la PPC. Les méthodes sérologiques sont aussi valables pour les enquêtes de contrôle et de détermination de prévalence ; elles sont essentielles si un pays souhaite être reconnu internationalement comme indemne de la maladie en l'absence de vaccination.*

Dans la mesure où des réactions croisées avec des anticorps Pestivirus de ruminants sont parfois rencontrées chez les porcs d'élevage, les épreuves de dépistage doivent être complétées par des épreuves de confirmation spécifiques du virus PPC. L'ELISA est relativement spécifique du virus

PPC, mais la méthode définitive de différentiation est l'épreuve de neutralisation comparative qui compare le titre en anticorps vis-à-vis des différentes espèces de Pestivirus.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : les vaccins contre la PPC utilisent des virus vivants atténués par passages sur cultures de cellules ou sur des espèces réceptives qui ne sont pas de la famille des suidés. La production de ces vaccins à virus vivants modifiés repose sur la validation du système lot-semence tenant compte de l'identité virale, de la stérilité, de la pureté, de l'innocuité, de la non transmissibilité, de la stabilité et de l'immunogénicité. Si le virus PPC est utilisé pour la production de vaccin ou lors d'épreuves virulentes, les locaux doivent répondre aux normes de confinement de l'OIE correspondant aux agents pathogènes du groupe 4.

Des vaccins inactivés de type conventionnel, impliquant le virus entier, ne sont pas disponibles. Des « vaccins sous-unitaires marqués » sont maintenant disponibles, qui, à la différence des vaccins à virus vivants atténués, induisent des anticorps qui peuvent être distingués de ceux induits par le virus naturel en utilisant une épreuve de diagnostic appropriée. Les « vaccins marqués » proposés à l'heure actuelle, utilisent la glycoprotéine majeure de l'enveloppe (E2-sous-unité) du virus PPC et sont produits sur cellules d'insecte grâce à la méthodologie de recombinaison de l'ADN.

A. INTRODUCTION

Les virus responsables de la peste porcine classique (PPC), de la diarrhée virale bovine (BVD, *Bovine Viral Diarrhoea* ou maladie des muqueuses) et de la maladie de la frontière (BD, *Border Disease*) sont des membres de la famille des *Flaviviridae*, appartenant au genre *Pestivirus*, et sont très proches au plan antigénique et structurel. Les signes cliniques et les lésions découvertes à l'autopsie de porcs morts de PPC sont très variables en raison de facteurs liés, à la fois au virus et à l'hôte. Bien plus, les infections congénitales de la truie par des pestivirus de ruminants peuvent conduire à une maladie cliniquement indistinguishable de la PPC (31, 33, 35).

L'atteinte de tous les groupes d'âge, accompagnée de fièvre, d'entassement, d'inappétence, d'abattement, de faiblesse, de conjonctivite, de constipation suivie par une diarrhée et d'une démarche chancelante, sont les signes essentiels. Plusieurs jours après l'apparition des signes cliniques, une coloration pourpre apparaît sur les oreilles, l'abdomen et à l'intérieur des cuisses. La mort survient en 1 à 3 semaines dans la forme aiguë. Une mort brutale, en l'absence de signes cliniques, n'est pas symptomatique de la PPC.

Dans certaines circonstances en rapport avec l'âge de l'animal et son état ainsi qu'avec la souche de virus en cause, des atteintes subaiguës ou chroniques peuvent se développer et se prolonger sur 2 à 4 semaines ou même des mois. La forme chronique conduit à un retard de croissance avec anorexie, fièvre intermittente et diarrhée. Les infections congénitales persistantes peuvent restées méconnues pendant des mois et peuvent être limitées à seulement quelques porcelets de l'élevage ou affecter un grand nombre d'animaux. Les signes cliniques sont équivoques : dépérissement apyrétique. Les infections chroniques persistantes conduisent toujours à la mort de l'animal. Les taux de mortalité dans un élevage, peuvent être légèrement supérieurs à ceux attendus. La PPC affecte le système immunitaire et la principale caractéristique en est une leucopénie généralisée, qui peut souvent être détectée avant l'apparition de la fièvre. L'immunosuppression peut entraîner l'apparition d'infections secondaires.

Dans les formes aiguës, les lésions macroscopiques peuvent être discrètes ou absentes. Dans les cas typiques, les nœuds lymphatiques sont hypertrophiés et marbrés de rouge, des hémorragies apparaissent sur les séreuses ou les muqueuses des organes intestinaux. Des infarctus peuvent être observés dans les reins. Dans les cas chroniques, des ulcères nécrotiques dits « en boutons de culotte » peuvent être observés dans la muqueuse du tractus gastro-intestinal, l'épiglotte et le larynx, en plus des lésions précédentes.

Les lésions microscopiques histologiques ne sont pas pathognomoniques. Il peut s'agir de dégénérescence parenchymateuse du tissu lymphatique, de proliférations cellulaires du tissu interstitiel vasculaire, et d'une méningo-encéphalomyélite non suppurée, avec ou sans manchons péri-vasculaires.

Une synthèse sur les techniques de diagnostic et la vaccination de la PPC a récemment été publiée par une source autorisée (3) qui, outre des lignes directrices générales, apporte des informations sur la validation et un avis scientifique sur l'applicabilité de certains produits commercialisés dans ces domaines.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Le polymorphisme et l'intensité variable des signes cliniques et lésionnels ne permettent pas de poser un diagnostic précis. D'autres maladies, telles que la peste porcine africaine, le syndrome dermatite et néphropathie du porc (PDNS pour *porcine dermatitis and nephropathy syndrome*), le syndrome de dépérissement post-sevrage (PMWS pour *post-weaning multisystemic wasting syndrome*), le purpura thrombocytopénique ainsi que diverses infections septicémiques telles que les salmonellose (notamment celles dues à *Salmonella choleraesuis*), les rougets, la pasteurellose, l'actinobacillose (due à *Actinobacillus suis*) et les infections à *Hemophilus parasuis*, peuvent être confondues avec la PPC aiguë. En fait, ces bactéries sont souvent responsables d'infections secondaires et, l'isolement de ces germes peut cacher la cause réelle de la maladie, le virus de la PPC. De même, le PDNS évoluant simultanément peut occulter une PPC sous-jacente.

C'est pourquoi, une tentative de diagnostic clinique ou lésionnel doit toujours être confirmée par des recherches de laboratoire. Étant donné que la fièvre est un des premiers symptômes de la PPC et qu'elle est concomitante de la virémie (7), la détection du virus ou de l'acide nucléique viral dans le sang total recolté sur héparine ou acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) ou dans les tissus prélevés chez des animaux fébricitants est la méthode de choix pour dépister précocement les élevages infectés. Cela est d'autant plus nécessaire à la vue des lourdes conséquences que l'existence d'un foyer de PPC peut causer pour le commerce international des porcs et de leurs produits.

Les méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la PPC visent la mise en évidence du virus, de son acide nucléique ou de ses antigènes ainsi que des anticorps qui lui sont spécifiques. Pour une interprétation correcte des résultats des épreuves, le vétérinaire doit accorder une attention particulière à l'apparition simultanée et groupée d'au moins 2 signes parmi les plus fréquents de la maladie signalés ci-dessus. La réalisation de prélèvements au hasard ne convient pas au diagnostic. De plus, les prélèvements sanguins destinés à la recherche du virus et les réactions de transcription inverse et d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) peuvent être réalisés sur un nombre plus important de porcs.

La PPC fait l'objet d'un contrôle officiel et le virus présente un haut risque de diffusion à partir du laboratoire : une analyse de risque doit être effectuée pour déterminer le niveau de biosécurité nécessaire au diagnostic et à la caractérisation du virus. Les locaux doivent répondre aux normes de Confinement correspondant au Groupe déterminé par l'évaluation du risque comme cela est souligné dans le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries », de ce *Manuel terrestre*. Les pays ne pouvant avoir accès à un tel laboratoire national ou régional, devront adresser les prélèvements à un Laboratoire de référence de l'OIE.

Les anticorps apparaissent durant la troisième semaine d'évolution de la maladie et persistent toute la vie chez les sujets survivants. Les prélèvements destinés à la recherche des anticorps sont effectués dans des tubes ordinaires non héparinés, chez les porcs convalescents et chez les porcs de l'élevage qui ont été en contact avec le virus, au moins 3 semaines après que le contact avec un foyer avéré a eu lieu.

1. Identification de l'agent pathogène

a) Méthodes immunologiques

- Épreuve d'immunofluorescence

L'immunofluorescence (IF) est rapide et peut permettre de détecter l'antigène du virus PPC sur des coupes au cryostat d'amygdale, de rate, de rein, de nœud lymphatique ou de portion distale de l'iléon. Les tissus doivent être prélevés sur plusieurs animaux fiévreux et/ou malades (4) et transportés sans conservateur, sous froid mais non congelés. Les coupes au cryostat sont colorées directement avec une immunoglobuline anti-PPC conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou indirectement à l'aide d'un conjugué FITC secondaire puis examinées au microscope à fluorescence. Au début de l'infection, le tissu amygdalien est le plus propice car il est le premier à être infecté par le virus quelle que soit la voie de pénétration (25). Dans les cas subaiguës ou chroniques, l'iléon est souvent positif et, parfois, constitue le seul tissu révélant une fluorescence. Un résultat négatif en IF ne peut permettre d'éliminer l'infection PPC. Lorsque la suspicion de PPC persiste, il doit être réalisé d'autres prélèvements ou des essais d'isolement du virus en cultures de cellules (par exemple sur rein de porc [PK-15] ou sur d'autres lignées d'origine porcine aussi sensibles et reconnues exemptes de contamination par un Pestivirus).

Dans les laboratoires qui ne maîtrisent pas parfaitement la technique IFI, les risques de faux résultats (positifs ou négatifs) sont relativement élevés. L'IFI devrait donc être utilisée uniquement dans les laboratoires ayant une bonne expérience de cette méthode, qui la réalisent en routine et dont le personnel a été formé à l'interprétation de la fluorescence.

• **Protocole**

Introduire des coupes témoins positif et négatif dans chaque série de prélèvements d'organe à examiner.

- i) Découper un fragment d'amygdale, de rate, de rein et d'iléon d'environ 1 × 1 × 0,5 cm, et le placer soit avec un composé de cryo-montage, soit avec de l'eau distillée, sur le support de tissu du cryostat.
- ii) Congeler le fragment d'organe sur le support du cryostat.
- iii) Effectuer des coupes ne dépassant pas 4 à 8 µm d'épaisseur et les étaler sur des lamelles couvre-objet (10 × 32 mm) dégraissées et dont un coin est coupé. Toutes les coupes sont montées avec le coin coupé de la lamelle dans la même direction (par exemple angle supérieur droit).
- iv) Après séchage, fixer les coupes ainsi montées, pendant 10 min à la température ambiante, dans de l'acétone (qualité analytique), ou à l'air pendant 20 min à 37 °C.
- v) Immerger rapidement les coupes dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), éliminer le fluide en excès à l'aide d'un papier filtre, et les placer (angle supérieur coupé à droite) sur un support dans une chambre humide dont le fond renferme une petite quantité d'eau.
- vi) Répartir l'immunoglobuline anti-PPC à la dilution recommandée, sur la totalité de la surface de la coupe et incubé pendant 30 min à 37 °C dans la chambre humide close. Si le conjugué FITC secondaire est nécessaire, laver la coupe 5 fois, pendant 2 min chacune, dans du PBS à la température ambiante, puis ajouter le conjugué FITC à la dilution requise et incubé comme précédemment.
- vii) Laver les coupes 5 fois, pendant 2 min chacune, dans du PBS, à la température ambiante.
- viii) Éliminer le PBS restant par contact de la lamelle avec un papier filtre fin, et monter la lamelle (avec la coupe entre la lamelle et la lame) avec un tampon de montage, sur une lame pour examen microscopique.
- ix) Éliminer l'excès de fluide de montage avec du papier filtre et examiner les coupes pour rechercher les foyers fluorescents, en utilisant un microscope à lumière ultra-violette. Une coupe PPC-positif montre des cellules émettant une fluorescence verte brillante. Dans les amygdales, la fluorescence de la bordure épithéliale des cryptes est particulièrement marquée. Dans le rein, la fluorescence est plus intense dans les tubules proximaux et distaux du cortex rénal et les tubes collecteurs de la médulla. Dans l'iléon, la fluorescence est plus accusée dans les cellules épithéliales des glandes de Lieberkühn, tandis que dans la rate, la réactivité est plus diffuse avec des concentrations de cellules lymphoïdes dans les gaines lymphoïdes péri-artérielles (PALS).

L'IF utilise une immunoglobuline anti-PPC préparée à partir d'un anticorps polyclonal du virus PPC incapable de distinguer les antigènes des différents pestivirus. Les conjugués utilisés pour l'IF sur les coupes au cryostat ou les cultures de cellules inoculées, doivent être élaborés à l'aide de gamma-globulines obtenues chez des porcs exempts d'agents pathogènes spécifiques (EAPS). La dilution de conjugué utilisée (au moins 1/30) doit ménager un maximum de brillance sur un minimum de coloration de fond. La réaction ne doit être réalisée que sur des échantillons prélevés sur des animaux morts depuis peu, car l'autolyse et la contamination bactérienne entraînent souvent une coloration parasite.

Les souches vaccinales de virus vivant modifié (VVM) se multiplient surtout dans les nœuds lymphatiques régionaux et dans l'épithélium des cryptes amygdaliennes. Les porcs vaccinés avec des souches VVM peuvent produire une IF positive durant les 2 semaines suivant la vaccination (22, 28). L'inoculation du lapin est utilisée pour différencier les souches de PPC lapinisées des souches sauvages. À l'opposé des souches sauvages, les souches lapinisées, inoculées par voie intraveineuse, entraînent une réaction fébrile et induisent une réponse immunitaire chez le lapin. Maintenant que le séquençage de l'acide nucléique est devenu une technique fiable, l'inoculation aux animaux n'est plus nécessaire pour faire la distinction entre les souches sauvages et les souches vaccinales du virus de la PPC.

Les porcs infectés par les pestivirus des ruminants peuvent donner, en IF, des réactions faussement positives. Les infections congénitales dues aux pestivirus des ruminants peuvent entraîner des signes cliniques et des lésions identiques à ceux et à celles de la PPC chronique (31, 33, 35). Les infections par le virus PPC ou les pestivirus des ruminants peuvent être différenciés en soumettant les sérums de la truie et de la portée, ou des autres sujets en contact avec un porcelet IF positif, à une épreuve de séroneutralisation vis-à-vis de chacun des virus. Si le virus a été isolé, ou si l'acide nucléique a été détecté à l'aide de la RT-PCR, un séquençage ultérieur représente un outil précis et rapide pour faire la distinction entre les pestivirus des ruminants et le virus de la PPC. Une autre méthode de différenciation de ces virus consiste en l'inoculation de porcelets séronégatifs avec une suspension du matériel suspect, suivie, 4 semaines plus tard au moins, d'épreuves de séroneutralisation pratiquées sur leur sérums pour la recherche des anticorps respectifs. Cependant, les épreuves de séroneutralisation peuvent prendre plusieurs jours et les méthodes d'inoculation à l'animal réclament plusieurs semaines.

- **Épreuve d'immunoperoxydase pour la différenciation des pestivirus par les anticorps monoclonaux**

Le recours à une série de 3 anticorps monoclonaux (AcMs), soit conjugués à la peroxydase de raifort (HRPO) ou à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), soit utilisés en association avec un conjugué anti-souris et détectant de façon spécifique respectivement toutes les souches PPC sauvages, les souches vaccinales PPC et les pestivirus des ruminants, permettrait une différenciation précise entre les souches sauvages et vaccinales PPC, d'une part, et entre virus PPC et les autres pestivirus, d'autre part (11, 36, 38). Une condition essentielle est que l'AcM anti-virus PPC reconnaisse toutes les souches sauvages et que l'AcM anti-vaccin reconnaisse toutes les souches vaccinales utilisées dans le pays. *Aucun AcMs ne réagit sélectivement avec tous les pestivirus de ruminants* (11). Le recours à un AcM différenciant la souche vaccinale PPC n'est pas nécessaire dans les zones où l'on ne vaccine pas. Une immunoglobuline polyclonale anti-PPC conjuguée à la peroxydase (HRPO) sert de témoin positif. Des précautions doivent être prises lorsque l'on utilise un seul AcM en confirmation unique de la nature PPC d'un isolat.

- **Protocole**

- Réaliser au cryostat au moins 8 coupes (4 à 8 µm) d'amygdale positive en IF ou d'un autre organe positif si l'on ne dispose pas d'amygdale.
- Fixer les coupes sur des lamelles couvre objet dans l'acétone (qualité analytique) pendant 10 min et laisser sécher à l'air.
- Préparer des dilutions appropriées des différents conjugués AcMs-peroxydase en PBS + 0,01 % de Tween 80 + 5 % de sérum de cheval, pH 7,6 (un FITC-AcMs peut aussi être utilisé, aussi bien qu'un AcM non conjugué, pourvu qu'un second conjugué soit utilisé).
- Après rinçage en PBS, recouvrir 2 coupes avec la dilution des conjugués monoclonaux respectifs et 2 coupes avec la dilution du conjugué polyclonal (témoins).
- Incuber à 37 °C pendant 1 h en chambre humide.
- Laver les coupes pendant 10 s, 6 fois, en PBS.
- Colorer les coupes avec la solution de substrat chromogène¹ fraîchement préparée, pendant 5 à 15 min à température ambiante.
- Rincer les coupes dans une solution en eau distillée d'acétate de sodium 0,05 M, pH 5,0, et les monter sur des lames pour examen microscopique.
- Examiner les coupes au microscope. Une coloration rouge foncé du cytoplasme des cellules épithéliales bordant les cryptes amygdaliennes indique la mise en évidence d'un virus par le conjugué correspondant et est considéré positive.
- Interprétation de l'épreuve :

Anticorps polyclonale	Anticorps monoclonal spécifique de			Interprétation
	Souche PPC	Souche vaccinale PPC	Souche BVD/BD	
+	+	–	–	Souche sauvage PPC
+	+	+	–	Souche vaccinale PPC
+	–	–	+	Souche BVD/BD
+	–	–	–	Autre pestivirus non-PPC*

* L'existence de nouvelles souches de PPC doit toujours être prise en compte et tout isolat de cas où la PPC est encore suspectée doit être envoyé à un Laboratoire de référence de l'OIE.

1 Solution de substrat chromogène

A. Solution stock de chromogène : 0,4 % de 3-amino-9-ethyl carbazole ; N,N-diméthyl-formamide (1 ml). Prendre garde aux **composés toxiques**. Les deux produits chimiques sont cancérigènes et irritants pour les yeux, la peau et l'appareil respiratoire.

B. 0,05 M d'acétate de sodium, pH 5,0 ; 19 ml (filtré stérilement à travers une membrane).

C. Solution stock de substrat (30 % de peroxyde d'hydrogène).

Conserver les solutions stock A et C dans l'obscurité et à 4°C et la solution B à température ambiante. La solution stock A peut être conservée à 4°C durant au moins 6 mois et la solution C durant au moins 1 an. Juste avant d'utiliser les solutions, diluer 1 ml de la solution A dans 19 ml de la solution B. Ajouter alors 10 µl de la solution stock C. Mélanger bien et colorer les coupes.

- **Méthode immuno-enzymatique de capture**

Pour un diagnostic rapide de la PPC chez des porcs vivants, des épreuves immuno-enzymatique (ELISA) de capture ont été mises au point pour détecter les élevages suspects d'avoir été récemment infectés. Les ELISAs sont du type sandwich double-anticorps, avec des anticorps monoclonaux et/ou polyclonaux dirigés contre diverses protéines virales et utilisables sur du sérum, la fraction leucocytaire sanguine, ou du sang total prélevé sur anticoagulant ; en outre, des kits de diagnostic peuvent être utilisés pour tester des homogénats de tissu centrifugés (8). La technique est relativement simple à effectuer, ne réclame pas d'équipement nécessaire à la culture de tissu, est automatisable et peut donner des résultats en une demi-journée. L'inconvénient d'être moins sensible que l'isolement viral, spécialement chez le porc adulte et lors de formes modérées ou sub-cliniques, est compensé par la possibilité de tester tous les porcs fiévreux suspects d'un élevage. Néanmoins, la faible spécificité de ces épreuves doit aussi être considérée. Le test ne convient pas pour le diagnostic de la PPC chez un seul animal.

b) Isolement du virus

L'isolement du virus en cultures de cellules est une méthode plus sensible mais plus lente pour le diagnostic de la PPC que l'immunofluorescence sur coupes en congélation. L'isolement est, au mieux, réalisé en cellules à division rapide PK-15 ensemencées sur des lamelles simultanément avec une suspension d'amygdale à 2 % dans le milieu de culture. D'autres lignées de cellules de porc peuvent être utilisées, mais elles doivent avoir démontré qu'elles sont au moins aussi sensibles que les cellules PK-15 pour l'isolement du virus PPC. Les cultures sont examinées par IF pour recherche des foyers fluorescents après 24 à 72 h, ou sont fixées pour coloration à l'immuno-peroxydase après 4 ou 5 jours d'incubation.

L'amygdale est le tissu de choix pour l'isolement du virus chez les porcs morts ou sacrifiés en vue du diagnostic. A défaut, la rate, le rein, l'iléon ou les nœuds lymphatiques peuvent aussi être utilisés.

Un protocole d'isolement est détaillé ci-dessous :

- i) Préparer une solution stock glutamine-antibiotiques concentrée 100 fois : dissoudre la glutamine (2,92 g) dans 50 ml d'eau distillée (solution A) et la stériliser par filtration. Dissoudre chacun des antibiotiques suivants dans 5 à 10 ml d'eau distillée stérile : pénicilline (106 Unités Internationales [UI]) ; streptomycine (1 g) ; mycostatine (5×10^5 U) ; polymyxine B (15×10^4 U) ; et kanamycine (1 g). Mélanger ces solutions d'antibiotiques (solution B). Mélanger stérilement les solutions A et B, ajuster à 100 ml avec de l'eau distillée stérile, et stocker en aliquots de 5 ml à -20°C . La composition exacte du mélange d'antibiotiques n'est pas essentielle, pour autant que la stérilité est garantie et que les cellules ne sont pas contaminées.
- ii) Couper 1 à 2 g de tissu en petits fragments et, en utilisant un mortier et un pilon ou tout autre appareil, les broyer dans une petite quantité de milieu de culture en présence de sable stérile, pour obtenir une pâte homogène. À défaut, utiliser un broyeur mécanique approprié à 4°C .
- iii) Faire une suspension à 20 % (poids/volume) en ajoutant de la solution saline de Hanks (BSS, *Balanced Salts Solution*) ou du milieu essentiel minimum de Hanks (MEM) ; 1 ml de la solution stock glutamine-antibiotiques est ajouté pour chaque 10 ml de suspension. Le mélange est conservé 1 heure à la température ambiante.
- iv) Centrifuger à 1 000 **g** pendant 15 min.
- v) Une monocouche de cellules PK-15 est trypsinisée, la suspension de cellules est centrifugée à 160 **g** pendant 10 min, et les cellules sont reprises à la concentration d'environ 2×10^6 cellules/ml dans du milieu de croissance (MEM d'Eagle avec des sels de Earle ; 5 % de sérum foetal de veau exempt de pestivirus ruminants et d'anticorps anti-pestivirus ; et 0,2 ml de solution stock glutamine-antibiotiques par 10 ml de suspension cellulaire). Par exemple, un flacon de 75 cm² donne environ 50 ml d'une suspension cellulaire à la bonne concentration.
- vi) Deux possibilités, soit :

Inoculation d'une suspension : mélanger 9 parties de suspension cellulaire (étape v) à une partie du surnageant tissulaire (étape iv) et ensemencer 1,0 à 1,5 ml dans 6 à 8 tubes de Leighton avec lamelles ou tout autre dispositif de culture de cellules appropriées. Trois tubes reçoivent 1,0 à 1,5 ml de suspension cellulaire seule en tant que témoins. Après achèvement de l'ensemencement des prélèvements, 3 tubes sont inoculés avec le virus PPC comme témoins positifs. Des précautions doivent être prises pour éviter une contamination croisée avec la suspension virale positive connue. Des cultures négatives doivent aussi être préparées. Incuber à 37°C .

Ou :

Inoculation d'une monocouche pré-établie : pour chaque tissu inoculer 1 à 1,5 ml de la suspension cellulaire (préparée à l'étape v) dans 6 à 8 tubes de Leighton avec lamelles ou tout autre flacon de

culture cellulaire approprié. Incuber à 37 °C pendant au moins 4 h et au plus 36 h. Retirer le milieu et inoculer 0,2 ml du surnageant (préparé à l'étape iv), incuber 1 h à 37 °C, rincer et recouvrir avec 1 ml de milieu de culture et incuber à 37 °C.

- vii) 1, 2 et 3 jours après l'ensemencement, 2 cultures, ainsi qu'une culture témoin positive et négative, sont lavées 2 fois, pendant 5 min chaque fois, dans du BSS Hanks, MEM Hanks ou du PBS, fixées à l'acétone froid (qualité analytique) pendant 10 min, et colorées directement avec un conjugué anti-PPC à la dilution appropriée ou indirectement, comme décrit à la Section B.1.a.

Si la suspension d'amygdale à 2 % se révèle toxique pour les cellules, l'épreuve sera renouvelée en utilisant une plus forte dilution ou un autre organe. Réaliser le test sur une monocouche préformée permettra d'éviter ce problème.

- viii) Après 3 lavage en PBS, de 5 min chacun, les lamelles sont montées en tampon carbonate/bicarbonate glyciné à 90 %, pH 8,0, et examinées pour recherche de foyers fluorescents.

À la place des tubes de Leighton, des plaques à 6 puits avec lamelles peuvent être utilisées. À défaut, il est possible d'utiliser pour l'isolement viral, des plaques de micro-titrage à fond plat ou des plaques M24. Dans ce cas, les plaques sont fixées et colorées comme décrit plus loin dans l'épreuve de neutralisation utilisant la peroxydase (NPLA).

Le sang total (sur héparine ou EDTA) des porcs cliniquement atteints est un bon prélèvement pour le diagnostic précoce de la PPC. La fraction leucocytaire ou d'autres composants peuvent être utilisés, mais pour des raisons de sensibilité et de simplicité, le sang total est préféré (10). Le protocole est le suivant :

- i) Congeler un échantillon de sang total à -20 °C puis, le décongeler au bain-marie à 37 °C.
- ii) Ensemencer 300 µl de sang hémolysé sur une couche monocellulaire de PK-15 parvenue à environ 75 % de confluence² dans une plaque M24, et laisser absorber pendant 1 h à 37 °C.
- iii) Éliminer l'inoculum, laver la monocouche cellulaire, une fois, avec du BSS Hanks ou du MEM Hanks, et ajouter le milieu de culture.
- iv) Après 3 à 4 jours d'incubation, les plaques sont lavées, fixées et colorées comme décrit plus loin pour le NPLA, en utilisant à chaque étape, un volume de 300 µl pour tenir compte d'une surface cellulaire plus large.

Note : cette méthode est moins sensible que celle, conventionnelle, d'isolement du virus pour la détection de la forme aiguë de PPC.

- **Transcription inverse couplée à une amplification en chaîne par polymérase**

De nombreuses méthodes de RT-PCR ont été décrites et sont encore développées (20). Cette alternative internationalement admise est rapide et plus sensible que les ELISAs de capture ou de l'isolement viral, ce qui la rend particulièrement efficace pour le diagnostic pré-clinique. Plusieurs protocoles de PCR en temps réel ont été décrits (14, 20, 24, 26, 27) et des exemples de protocole peuvent être obtenus par la littérature ou auprès des Laboratoires de référence de l'OIE pour la PPC (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). En raison de sa rapidité et de sa sensibilité, la RT-PCR constitue une approche utile pour l'étude des cas suspects de la maladie et est désormais acceptée par de nombreux pays et l'Union Européenne (UE) (1). Cependant, il convient de garder présent à l'esprit qu'une contamination au laboratoire peut entraîner des résultats faussement positifs et que des résultats faussement négatifs peuvent être dus à des inhibiteurs présents dans l'échantillon. Tout résultat positif enregistré lors de premiers foyers doit systématiquement être confirmé par d'autres épreuves. Il est indispensable d'inclure dans l'épreuve un nombre adéquat de témoins positifs et négatifs ; il est aussi recommandé d'inclure des témoins internes. Pour plus de détails sur les épreuves de PCR, voir le Chapitre 1.1.5., « Validation et contrôle de qualité des épreuves d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) pour le diagnostic des maladies infectieuses ». Cette épreuve peut être appliquée sur des échantillons de sang individuels ou de mélange aussi bien que sur des organes et a été utilisée avec succès pour le contrôle des épizooties.

L'épidémiologie moléculaire de la PPC repose sur la comparaison des différences génétiques existant entre les isolats de virus. L'amplification en RT-PCR de l'ARN PPC suivi du séquençage des nucléotides, est la voie la plus simple d'obtenir les données « séquence » pour faire ces comparaisons. Un certain nombre de régions différentes du génome PPC peut être ciblé pour les études épidémiologiques (23). Deux régions ont été très étudiées et fournissent une large série de données « séquence » avec lesquelles les nouveaux isolats peuvent être comparés. Une de ces régions se trouve dans la région 5'-non codante (5'NCR) du génome (150 nucléotides) et l'autre, dans le gène de la glycoprotéine majeure E2 (190 nucléotides). En bref,

2 L'inoculation simultanée, tout en étant légèrement plus sensible, convient moins du fait que l'anticoagulant peut gêner l'adhésion des cellules à la surface de la plaque.

la méthode retenue consiste à extraire l'ARN viral de cultures infectées de cellules PK-15, à effectuer la RT-PCR pour amplifier une des deux cibles dans la région 5'NCR ou dans le gène E2, puis à déterminer la séquence nucléotidique des produits et à la comparer avec les informations séquentielles déjà stockées dans les bases de données. Une base de données de ces séquences peut être obtenue auprès du Laboratoire de référence de l'OIE pour la PPC (Hanovre, Allemagne). Des découvertes récentes lors de l'étude des séquences de pestivirus de ruminants mettent en évidence le besoin d'analyser par cette méthode de nombreuses régions du génome pour typer les souches de façon précise (15). Les isolats de virus PPC provenant de foyers primaires, doivent être envoyés à un Laboratoire de référence de l'OIE pour les études en épidémiologie moléculaire. Une autorisation d'importation doit être obtenue avant l'expédition.

2. Épreuves sérologiques

La mise en évidence des anticorps spécifiques du virus est particulièrement utile dans les élevages suspects d'infections par des souches de basse virulence. En raison de l'effet immunosuppresseur du virus PPC, les anticorps ne peuvent être révélés avant 21 jours post-infection. Les recherches sérologiques visent à détecter les foyers résiduels d'infection, tout particulièrement parmi les nouveau-nés de l'élevage, mais sont aussi utiles en phase terminale d'éradication.

Puisque l'incidence de l'infection par les pestivirus des ruminants peut être élevée dans les élevages, seuls les épreuves capables de différencier les anticorps PPC des anticorps BVD/BD sont appropriées. La séroneutralisation virale et l'ELISA utilisant des AcMs, satisfont l'exigence de sensibilité, mais les résultats positifs en ELISA doivent être confirmés par une épreuve comparative en séroneutralisation.

Les épreuves de séroneutralisation sont réalisées en cultures de cellules selon la méthode virus constant/sérum variable. Comme le virus PPC n'est pas cytopathogène, tout virus non neutralisé doit être détecté, après sa multiplication, par un système révélateur. L'épreuve de NPLA (29) et l'épreuve de neutralisation virale en immunofluorescence (FAVN) (18) sont les techniques les plus utilisées. Ces deux épreuves peuvent être conduites en plaques de micro-titrage. À l'heure actuelle, le système NPLA est préféré car sa lecture est plus facile et les résultats peuvent être obtenus à l'aide d'un microscope inversé, bien qu'une estimation puisse être réalisée également à l'œil nu.

a) Épreuve de neutralisation en immunoperoxydase (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

La NPLA est réalisée en plaques de micro-titrage à fond plat. Les sérums sont d'abord inactivés à 56 °C pendant 30 min. Dans le cadre des échanges internationaux, il est recommandé d'utiliser une dilution sérique initiale de 1/5 (dilution finale au 1/10). Pour les contrôles de surveillance dans un pays, une dilution de 1/10 peut suffire. Les témoins appropriés de spécificité et de sensibilité des réactions, doivent être incorporés dans chaque épreuve.

• Protocole

- i) Répartir des dilutions de sérum en milieu de croissance (MEM Eagle avec 5 % de sérum de veau fœtal et des antibiotiques) sous un volume de 50 µl, chacune dans 2 puits d'une plaque de micro-titrage. Le sérum de veau fœtal doit être exempt de virus BVD et d'anticorps correspondants. Un troisième puits peut être inclus pour chaque échantillon. Ce puits contient du sérum mais pas de virus et est utilisé comme témoin sérum (cyto-toxicité et/ou coloration non spécifique).
- ii) Ajouter 50 µl de suspension virale à chaque puits, diluée en milieu de croissance pour contenir environ 100 DICT₅₀/50 µl, et mélanger les contenus sur un agitateur de plaques pendant 20 s.
- iii) Incuber les plaques dans une étuve à CO₂ pendant 1 h à 37 °C.
- iv) Ajouter dans tous les puits, 50 µl de milieu de culture contenant 2×10^5 cellules/ml.
- v) Laisser les cellules se multiplier à 37 °C en atmosphère à 5 % de CO₂ jusqu'à la confluence, obtenue habituellement en 3 à 4 jours.
- vi) Éliminer le milieu de culture et rincer les plaques une fois en NaCl 0,15 M.
- vii) Éponger les plaques en les tapotant sur une serviette.
- viii) Les couches monocellulaires peuvent être fixées de plusieurs façons, soit
 - les plaques sont incubées pendant 45 min à 37 °C, puis pendant au moins 45 min à -20 °C. Les plaques sont retirées du congélateur, les puits sont remplis avec 100 µl de paraformaldéhyde à 4 % en PBS et ré-incubées pendant 5 à 10 min à température ambiante. Le paraformaldéhyde est éliminé et les plaques rincées en NaCl 0,15 M ; soit
 - les plaques sont incubées à 70 ou 80 °C pendant 1 à 2 h, ou

- les plaques sont fixées dans de l'acétone à 80 % et incubées à 70 ou 80 °C pendant 1 h, ou
 - les plaques sont fixées à l'acétone à 20 % en PBS pendant 10 min suivi d'un séchage complet à 25 ou 30 °C pendant 4 h. (Ceci peut être obtenu plus rapidement à l'aide d'un sèche-cheveux ; après 3 à 5 min le séchage complet est obtenu comme en atteste la couleur blanchâtre de la mono-couche cellulaire).
- ix) Ajouter à chaque puits, 50 µl d'un sérum de porc hyperimmun anti-PPC ou un anticorps monoclonal, dilué en NaCl 0,5 M contenant 1 % de Tween 80 + 0,1 % d'azide de sodium, pH 7,6. Incuber 15 min à 37 °C. La dilution de l'anti-sérum à utiliser doit être déterminée par titrage préalable : c'est à dire qu'un sérum donnant un titre NPLA de 1/30 000, doit être utilisé au 1/100.
- x) Laver les plaques 5 fois en NaCl 0,15 M contenant 1 % de Tween 80, pH 7,6.
- xi) Ajouter à chaque puits, 50 µl d'une IgG anti-porc (ou anti-souris) conjuguée à la peroxydase (IgG-HRPO) convenablement diluée en NaCl 0,5 M avec 1 % de Tween 80, pH 7,6, puis incuber à 37 °C pendant 10 min.
- xii) Laver les plaques 5 fois en NaCl 0,15 M contenant 1 % de Tween 80, pH 7,6.
- xiii) Ajouter 50 µl de solution du substrat chromogène à chacun des puits et laisser se développer la coloration pendant 15 à 30 min à température ambiante. Cette solution est décrite dans la Section B.1.a « Protocole d'immuno-peroxydase pour la différenciation des pestivirus par les anticorps monoclonaux ».
- xiv) L'épreuve est lue à l'œil nu. Les couches de cellules infectées sont totalement ou partiellement colorées en rouge-brun. La couche cellulaire doit être examinée au microscope à faible grossissement pour déterminer la dilution finale. Le cytoplasme des cellules infectées est coloré en rouge foncé.
- xv) Les témoins suivants sont inclus dans l'épreuve : témoin cellules, témoin sérum positif et titrage rétrospectif du virus utilisé. Le titrage rétrospectif doit confirmer que le virus a été utilisé à une concentration située entre 30 et 300 DICT₅₀/50 µl.

NOTE : Les durées d'incubation ci-dessus ne sont qu'indicatives. Des durées d'incubation plus longues avec des dilutions optimisées pour ces durées peuvent être envisagées pour économiser les réactifs.

b) Épreuve de neutralisation virale en fluorescence (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Méthode avec des tubes de Leighton :

- i) Ensemencer une suspension de cellules PK-15 à une concentration de 2×10^5 cellules/ml dans des tubes de Leighton munis de lamelles.
- ii) Incuber les cultures à 37 °C pendant 1 à 2 jours jusqu'à obtenir 70 à 80 % de confluence.
- iii) Inactiver les sérums à 56 °C pendant 30 min. Dans le cadre d'échanges internationaux, il est préférable d'utiliser une dilution initiale de 1/5 (dilution finale de 1/10).
- iv) Incuber un volume égal de sérum dilué et de suspension virale contenant 200 DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) par 0,1 ml, à 37 °C, pendant 1 à 2 h. Ainsi une quantité constante de 100 DICT₅₀ de virus PPC est utilisée dans chaque puits réaction.
- v) Enlever les lamelles des tubes de Leighton, laver rapidement dans du milieu sans sérum, couvrir les couches de cellules avec le mélange sérum/virus (de l'étape iv) et incuber à 37 °C pendant 1 h en atmosphère humide.
- vi) Placer la lamelle dans un tube de Leighton propre et incuber les cultures en milieu de maintien pendant 2 jours supplémentaires.
- vii) Enlever les lamelles des tubes de Leighton, laver les couches cellulaires 2 fois, pendant 5 min, dans du PBS, pH 7,2, fixer dans l'acétone pur pendant 10 min, et colorer avec la dilution appropriée de conjugué pendant 30 min, à 37 °C, avant lavage.
- viii) Monter les lamelles sur des lames pour examen microscopique dégraissées, à l'aide d'un tampon carbonate/bicarbonate pH > 8 glyciné, et examiner en fluorescence.

Lorsque l'épreuve FAVN est effectuée en plaques de micro-titrage, le protocole du NPLA (voir ci-dessous) peut être appliqué jusqu'à l'étape viii). Les plaques sont alors colorées avec la dilution du conjugué pendant 30 min, à 37 °C, et examinées en fluorescence. Note : pour la recherche de la fluorescence, il est recommandé d'examiner les plaques à l'aide d'un objectif de longue focale.

Parfois, les sérums de porcs infectés par les virus BVD ou BD réagissent en FAVN ou NPLA à faible dilution comme s'ils étaient infectés par le virus PPC. L'importance de la réactivité croisée dépend de la souche de pestivirus des ruminants responsable et du délai entre l'infection et le prélèvement (37). L'habituel titre élevé en anticorps atteint après exposition au virus PPC, y compris aux souches de basse virulence, permet de recourir à des dilutions initiales comparativement plus hautes dans les épreuves NPLA pour la recherche des anticorps PPC, de façon à éviter la plupart, des réactions croisées, mais pas toutes (29, 30). En cas de doutes persistants, la réalisation des épreuves comparatives utilisant une souche de virus PPC, une souche de virus BVD et une souche de virus BD, représentatives de la région ou du pays, se révèle utile. Les épreuves de neutralisation comparatives évaluent les titres obtenus avec la même série de dilution de raison 2 du sérum suspect, chacune des dilutions étant testée en double contre 100 DICT₅₀ de chacun des virus choisis. Les épreuves comparatives sont effectuées selon les protocoles décrits pour l'épreuve FAVN ou NPLA ; les lignées cellulaires utilisées doivent être sensibles au virus BVD et BD. Les titres de neutralisation sont exprimés sous la forme de la réciproque de la plus haute dilution du sérum qui prévient la réplication virale dans la moitié des doubles puits. Une différence de 3 fois ou plus entre les valeurs de 2 titrages doit être considérée comme significative d'une infection par l'espèce virale donnant le titre le plus élevé. Il peut se révéler nécessaire d'utiliser des souches différentes du même génotype et/ou de tester plusieurs porc d'un troupeau infecté afin d'obtenir un résultat définitif.

c) Méthode immuno-enzymatique (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Les techniques indirectes, de blocage ou de compétition peuvent être retenues et effectuées sur des supports appropriés ; plusieurs ont été décrites (par ex. 5, 13, 17, 21, 34). Les épreuves choisies doivent minimiser les réactions croisées avec le virus BVD et les autres pestivirus. Cependant l'épreuve doit assurer l'identification de toutes les infections PPC et à toutes les étapes de la réponse immunitaire à l'infection.

Antigène : l'antigène doit dériver ou correspondre aux protéines virales de l'une des souches recommandées du virus PPC. Les cellules utilisées pour préparer l'antigène doivent être exemptes de toutes infections par l'un des autres pestivirus.

Antisérums : les anti-sérums polyclonaux des épreuves de compétition ou de blocage doivent être produits sur porc ou lapin par infection à l'aide de l'une des souches de virus PPC recommandées ou avec la souche C lapinisée. Les anticorps monoclonaux doivent être dirigés contre ou correspondre à une protéine immunodominante du virus PPC. Les épreuves indirectes doivent utiliser une immunoglobuline anti-porcine qui détecte à la fois les IgG et les IgM.

La sensibilité de l'ELISA doit être suffisamment élevée pour reconnaître positifs tous les sérums d'animaux convalescents, c'est-à-dire au moins 21 jours post-inoculation, qui réagissent à l'épreuve de séroneutralisation. L'ELISA peut seulement être utilisé sur des échantillons de sérum ou de plasma provenant de porcs individuels. Si la méthode utilisée n'est pas spécifique de la PPC, les échantillons positifs devront être examinés à l'aide d'épreuves discriminant le virus PPC des autres pestivirus.

L'ELISA « complex-trapping blocking » (5) est basé sur une méthode en 1 étape valable pour l'utilisation de robots automatisant l'ELISA. Les sérums sont testés non dilués. L'épreuve est rapide, facile à réaliser et détecte les anticorps contre les souches de basse virulence du virus PPC de façon précoce après l'infection. Comme les AcMs sont spécifiques de la PPC, l'ELISA « complex-trapping blocking » ne détectera que rarement les anticorps contre le virus BVD, bien que le problème puisse persister avec les anticorps contre le virus BD. Les sérums positifs font l'objet d'une confirmation en NPLA.

Un nouvel ELISA a été décrit récemment qui utilise une protéine dérivée de peptides viraux (19). Le test présente une plus grande sensibilité et permet une détection plus précoce des anticorps que les ELISA conventionnels, mais sa réactivité vis-à-vis des anticorps induits par les diverses souches du virus de la PPC n'est pas encore connue.

Des informations complémentaires sur les kits de diagnostic commercialisés peuvent être obtenues auprès des Laboratoires de référence de l'OIE.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'existe pas de vaccin à virus complet inactivé efficace contre la PPC.

C1. Vaccins à virus vivant modifié

Les vaccins VVM sont produits à partir de souches de virus PPC atténuées par passages soit sur cultures de cellules, soit sur une espèce animale réceptive n'appartenant pas à la famille des suidés. La production est conduite en culture de cellules ou chez des non-suidés selon le système lot-semence. Celui-ci doit être validé en ce qui concerne l'identité, la stérilité, la pureté, l'innocuité, la non transmissibilité, la stabilité et l'immunogénicité.

Les lignes directrices pour la production des vaccins vétérinaires sont données au Chapitre 1.1.8, « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Ces lignes directrices du Chapitre 1.1.8 sont d'ordre général et peuvent être complétées par des dispositions nationales ou régionales.

Les locaux dédiés à la production vaccinale doivent répondre aux normes de biosécurité. Si le virus PPC est utilisé pour la production ou pour les épreuves de virulence, cette partie des locaux où ces activités sont menées doivent répondre aux normes de confinement des agents pathogènes du groupe 4 comme cela est souligné dans le Chapitre 1.1.2.

Pour produire un lot semence et un vaccin fini de haute qualité, les conditions optimales de rendement en virus doivent être déterminées. Pour la production vaccinale en cultures de cellules, des courbes expérimentales de croissance doivent être effectuées afin d'étudier les effets de la composition du milieu, de la régulation du pH et de la concentration de l'atmosphère en CO₂, initiant la concentration des cellulesensemencées, le rapport entre la surface de la couche cellulaire et le volume de milieu, la phase de croissance cellulaire au moment de l'infection virale, l'état stationnaire ou roulant des flacons durant la réplication virale, etc. Pour les vaccins produits chez l'animal, l'âge, la souche, le poids, l'importance de l'inoculum (nombre de DI₅₀ animal [Dose infectant 50 % des animaux considérés]), la pathogénie de l'infection et les signes cliniques, sont les facteurs qui doivent être étudiés pour déterminer le pic de la production virale et les tissus à récolter.

Indépendamment de la méthode de production, le substrat doit être récolté de façon aseptique et doit être soumis à un cycle de congélation-décongélation destiné à libérer les virus associés aux cellules. Les débris cellulaires et les fragments de tissus sont éliminés par filtration ou légère centrifugation. Un stabilisant est ajouté, tel que du lactose à une concentration finale de 5 %. Le vaccin est homogénéisé avant lyophilisation pour assurer l'uniformité du lot.

Le virus vaccin du produit fini ne doit pas différer de plus de 5 passages du matériel utilisé pour valider le lot-semence. Le vaccin commercial doit être produit en lots lyophilisés comme un produit homogène.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Pour valider un lot-semence pour un vaccin PPC à VVM, des échantillons de lot-semence doivent être soumis à des essais pilotes. Mis à part les tests d'identité, de stérilité, de pureté et de stabilité de l'atténuation, les essais pilotes peuvent aussi être réalisés avec des échantillons représentatifs du produit fini commercial. Ces échantillons doivent correspondre au même lot-semence ayant subi les tests précisés ci-dessus.

En l'absence d'autres spécifications, tous les porcs utilisés en essais pilotes ont un âge compris entre 6 et 8 semaines, sont en bonne santé, exempts d'anticorps contre les virus PPC et BVD, de la même race et du même élevage, regroupés au hasard, si nécessaire, et placés dans les mêmes conditions. Les truies gestantes doivent être de caractéristiques identiques.

Le virus semence doit être stérile et doit induire des anticorps spécifiques neutralisant une souche virulente de virus PPC, chez les porcs.

b) Méthode de culture

La production est effectuée en cultures de cellules ou chez un hôte réceptif n'appartenant pas à la famille des suidés.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

i) Pureté

Le vaccin doit être virologiquement pur.

Trois porcs séronégatifs sont inoculés, chacun par voie intramusculaire, avec une quantité de virus lot-semence équivalente à 10 fois la quantité contenue dans une dose de vaccin. Ceci est répété

3 semaines plus tard à la même dose et par la même voie. Des échantillons de sérum sont prélevés 2 semaines après la dernière inoculation et testés par la méthode la plus sensible pour l'absence d'anticorps vis-à-vis des virus de la peste porcine africaine, de la maladie d'Aujeszky, de la BVD, de la fièvre aphteuse (tous les types), de la gastro-entérite transmissible, de la maladie vésiculeuse des suidés, du syndrome respiratoire et reproductif porcin, de la grippe porcine (types H1N1 et H3N2), des adénovirus porcins, des teschovirus porcins (types 1 et 2), des parvovirus et circovirus porcins (type 1 et 2).

ii) *Innocuité*

Les vaccins doivent être testés quant à leurs effets pathogènes sur des porcs sains et aussi sur des porcs qui pourraient être immunodéprimés du fait de la présence d'infections concomitantes ou de l'administration de médicaments ; les tests doivent aussi vérifier que les vaccins ne traversent pas la barrière placentaire chez les truies en gestation.

Pour les tests d'innocuité chez les porcs normaux, 10 porcs séro-négatifs sont chacun inoculés par voie intramusculaire avec 10 doses de vaccin. Dix autres porcs servent de témoins. Tous les porcs sont observés durant les 3 semaines suivantes. Les températures corporelles sont enregistrées et des échantillons de sang sont prélevés sur anti-coagulant, quotidiennement durant la première semaine. Les poids sont relevés à l'inoculation et 2 semaines plus tard. Aucun animal ne doit mourir ni montrer des signes de maladie dus au virus (lot-semence) vaccinal. La moyenne journalière des températures corporelles du groupe ne doit pas atteindre 40,5 °C ou plus durant toute la période de l'essai. Le gain de poids moyen ne doit pas tomber significativement ($p < 0,05$) en dessous de celui des témoins. La leucopénie (nombre de globules blancs $< 7 \times 10^6$ cellules/ml) peut être écartée si elle intéresse un seul sujet, pendant 1 jour.

Pour vérifier le degré d'atténuation, même chez des porcs immunodéprimés, 10 porcs sont soumis à une immuno-suppression par injections quotidiennes, à chacun, de 2 mg/kg de poids vif de prednisolone, pendant 5 jours consécutifs. Le troisième jour, chaque animal est inoculé avec l'équivalent d'une dose de vaccin et gardé en observation les 3 semaines suivantes. Aucun animal ne doit mourir ou devenir malade à cause du virus vaccinal.

Pour vérifier l'innocuité chez les femelles en gestation, 10 truies à 25–35 jours de gestation, sont inoculées par voie intramusculaire avec l'équivalent d'une dose de vaccin. Un autre groupe de 10 sujets de même race et origine et au même stade de gestation, sert de témoin. La vaccination ne doit pas interférer avec une gestation conduite à son terme et le nombre de porcelets nés du groupe test ne doit pas être significativement plus faible ($p < 0,05$) que celui issu des truies témoins.

Pour les essais terrain, un minimum de 200 porcs est utilisé, engendrés et élevés par au moins 20 mères, et séro-négatifs vis-à-vis de la PPC et de la BVD. Les portées sont également distribuées sur au moins 2 fermes. La moitié des porcelets de chaque portée est inoculée par voie intramusculaire, à l'âge de 7 à 14 jours, avec l'équivalent d'une dose de vaccin. Les congénères non inoculés servent de témoins. Tous les porcelets sont pesés au moment de l'inoculation et 2 semaines plus tard, et sont mis en observation durant 3 semaines. Un taux de mortalité excédant 5 % dû à des causes autres que la vaccination, invalide l'essai. Aucun animal ne doit mourir ou montrer des signes de maladie en rapport avec le virus vaccinal. Le gain moyen de poids des porcs inoculés dans les portées, ne doit pas être inférieur à 20 % de celui des témoins, durant les 2 semaines post-inoculation.

iii) *Non transmissibilité*

Pour confirmer la non transmissibilité, 24 porcs séro-négatifs sont divisés en 4 groupes de taille égale. Cinq porcs de chaque groupe sont inoculés par voie intramusculaire avec l'équivalent d'une dose de vaccin. Les porcs restants représentent les témoins contact. Tous les porcs sont éprouvés 6 semaines plus tard avec au moins 10^5 DIP₅₀ (Dose infectant 50 % des porcs) d'une souche virulente de virus PPC. Tous les porcs contact doivent être sérologiquement négatifs au moment de l'infection et doivent succomber dans les 3 semaines. Tous les porcs vaccinés doivent rester bien portants et survivre.

iv) *Stabilité de l'atténuation*

Pour confirmer la stabilité de l'atténuation du virus, 2 porcs sont inoculés par voie intramusculaire avec une quantité de virus lot-semence équivalent à 100 doses de vaccin, puis sacrifiés 6 à 7 jours plus tard. Les amygdales de chaque porc sont rassemblées et mises en suspension à 10 % en PBS, pH 7,2. Cette dernière est utilisée pour inoculer 2 autres porcs par voie intramusculaire avec 2 ml, et ceux-ci sont sacrifiés à leur tour 6 à 7 jours plus tard. Ce protocole est répété 5 fois. Durant ces passages, le tissu amygdalien peut être stocké à 4 °C, si le stockage est de moins de 24 h, ou à -70 °C pour des périodes plus longues. Simultanément, la présence de l'antigène PPC est vérifiée à chaque passage par l'IF direct sur des coupes au cryostat des amygdales ou par isolement du virus sur un substrat approprié. Si la présence du virus PPC ou de son antigène ne peut être démontrée après certains passages, une seconde série de passage est réalisée pour révéler l'infection, en commençant avec les derniers 2 porcs des séries précédentes.

Cinq porcs sont inoculés par voie intramusculaire avec le sixième passage du virus lot-semence, équivalent à une dose de vaccin, ou, si ce passage n'a pas été atteint, le plus haut passage des 2 séries où le virus ou l'antigène viral a été détecté. Cinq porcs supplémentaires sont de façon similaire inoculés avec une dose de virus lot-semence, équivalent à une dose de vaccin. Tous les porcs sont pesés au moment de l'inoculation et de nouveau 2 semaines plus tard. Le sang est prélevé quotidiennement sur anti-coagulant durant la première semaine, et tous les porcs sont mis en observation pendant 3 semaines. Aucun animal ne doit mourir ou devenir malades en raison du virus vaccin. Le gain moyen de poids des deux groupes durant les deux premières semaines, ne doit pas différer significativement ($p < 0,05$). Une leucopénie (nombre de globules blancs $< 7 \times 10^6/\text{ml}$) est tolérée, au plus chez un porc de l'un ou l'autre groupe, pendant 1 jour.

v) *Immunogénicité*

Pour démontrer l'efficacité immunogène, 10 porcs reçoivent chacun une quantité de virus équivalent à une dose de vaccin, et 2 autres porcs sont conservés séparément comme témoins non inoculés. Tous les porcs sont éprouvés 7 jours plus tard avec 10^5 DIP₅₀ d'une souche virulente de virus PPC. Seuls les témoins doivent mourir.

Pour tester la durée de l'immunité, 10 porcs reçoivent chacun une dose, et 2 autres sont maintenus séparément comme témoins. Six mois plus tard, les sérums des porcs vaccinés font l'objet d'une recherche d'anticorps anti-PPC ; au moins 8 porcs doivent être positifs. Tous les porcs sont alors éprouvés avec au moins 10^5 DIP₅₀ d'une souche virulente PPC et observés durant 3 semaines. Seuls les témoins doivent mourir.

Pour tester la protection contre le développement du syndrome truie-porteuse, 20 truies gestantes à la même phase de gestation sont réparties au hasard en 2 groupes. Les truies d'un groupe sont vaccinées 1 ou 2 fois avec une quantité de virus équivalente à une dose de vaccin, et sont éprouvées par voie intranasale, 4 semaines après la dernière vaccination, avec une souche sauvage de basse virulence, en même temps que les truies non vaccinées témoins. Toutes les truies sont sacrifiées 4 semaines après l'épreuve et les fœtus sont examinés pour la présence du virus PPC ou de l'antigène viral. La vaccination doit réduire de façon significative la transmission transplacentaire du virus.

Sous les conditions de conservation spécifiées par le fabricant pour le produit fini, un volume de virus équivalent à une dose de vaccin doit maintenir son immunogénicité au moins jusqu'au terme de la durée de conservation annoncée.

2. Méthode de fabrication

Chaque lot de vaccin PPC à VVM doit provenir du même lot-semence utilisé pour les essais pilotes. Aussi chaque lot doit-il être préparé selon le protocole de production et sous les conditions établies pour l'enregistrement du produit fini. Les propriétés de chaque lot et celles du lot-semence doivent être vérifiées comme étant uniformes.

3. Contrôles en cours de fabrication

Le protocole de production dépendra de la souche vaccinale, des modalités de production (animaux ou cultures de cellules), et des infrastructures disponibles. Les normes pour les vaccins en cultures de cellules peuvent varier selon le système de production adopté, à savoir, des cultures de cellules de première explantation, des lignées cellulaires, des cultures en couches monocellulaires ou en suspension.

4. Contrôle des lots

Tous les porcs utilisés dans les contrôles de lots doivent être âgés de 6 à 8 semaines et exempts d'anticorps vis-à-vis des virus PPC et BVD. Ils doivent être de même origine, race, élevage, et répartis au hasard en autant de groupes que nécessaire.

a) Identité

Le vaccin doit induire des anticorps neutralisants vis à vis d'une souche virulente de virus PPC.

b) Stérilité

Les tests de stérilité et d'absence de contamination du matériel biologique peuvent être trouvés dans le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

c) Innocuité

Trois porcs reçoivent chacun, par voie intramusculaire, 10 doses de vaccin reconstitué, en une seule injection. Les porcs sont observés pendant les 3 semaines suivantes et les températures corporelles sont relevées quotidiennement pendant la première semaine. Aucun porc ne doit succomber ou présenter des signes de maladie attribuable au vaccin ; la moyenne quotidienne des températures ne doit jamais dépasser 40,5 °C, et les porcs doivent croître normalement.

d) Pureté

Le lot doit être virologiquement pur. Pour apprécier cela, 3 porcs reçoivent chacun par voie intramusculaire 10 doses de vaccin. Des échantillons de sérums sont prélevés au moment de l'inoculation et, de nouveau, 5 semaines plus tard. Ces sérums sont testés pour la recherche d'anticorps anti-BVD (neutralisation pendant 1 h à 37 °C) et anti-parvovirus porcins (inhibition de l'hémagglutination utilisant 4 unités hémagglutinantes). L'ensemble des 3 porcs doit rester en bonne santé. Les tests de pureté virologique ne sont pas nécessaires lorsque les vaccins sont produits sur lapins.

e) Activité

L'activité est exprimée en nombre de doses protégeant à 50 % (DP₅₀) contenues dans une dose de vaccin. Une dose de vaccin correspond à au moins 100 DP₅₀.

Deux groupes de 5 porcelets, âgés de 6 à 8 semaines, reçoivent par voie intramusculaire, respectivement, une dilution en solution saline tamponnée pH 7,2, de 1/40 et de 1/160 du vaccin reconstitué. Les porcs vaccinés ainsi que 2 témoins, sont éprouvés par voie intramusculaire avec 10⁵ DIP₅₀ d'une souche virulente de virus PPC, 2 semaines plus tard. Les porcs sont observés durant les 2 semaines suivantes, période durant laquelle les 2 témoins doivent mourir. À partir des porcs qui survivent sans montrer de signes cliniques de PPC, le nombre de DP₅₀ contenues dans le vaccin est calculé par les méthodes statistiques.

Ce test d'activité peut être remplacé par un essai d'inféctivité, à condition que le fabricant puisse démontrer qu'il existe une relation distincte et reproductible entre le contenu en virus du vaccin et la protection qu'il confèrera aux porcs vis-à-vis de l'épreuve virulente.

f) Stabilité

La période de validité d'un lot de vaccin PPC lyophilisé ne doit pas être inférieure à 1 an.

C2. Vaccins avec marqueur sérologique

En dépit de l'existence de vaccins VVM contre la PPC, inoffensifs et efficaces, leur utilisation a été déconseillée dans l'UE et dans quelques autres pays indemnes de PPC ou pays voisins, en raison du fait que les anticorps induits par de tels vaccins ne peuvent être distingués des anticorps induits par le virus sauvage. Un « vaccin avec marqueur sérologique » qui permet la distinction entre les animaux infectés et les animaux vaccinés (DIVA) ne présente pas cet inconvénient : il peut entraîner une réponse immunitaire protectrice qui peut être distinguée de la réponse immunitaire induite par une souche sauvage. Un pré-requis supplémentaire pour toute stratégie DIVA est la disponibilité d'une épreuve sérologique d'accompagnement qui soit hautement discriminante afin de mettre en évidence l'absence d'infection et de détecter les infections résiduelles.

Les exigences minimales pour les vaccins marqués et les épreuves discriminantes d'accompagnement ont été formulées comme suit (6) :

a) Vaccin

Le vaccin doit fournir une protection contre toutes les contaminations naturelles (par exemple : il doit prévenir l'apparition des signes cliniques et empêcher la ré-excrétion du virus). L'efficacité de la vaccination doit être expérimentalement démontrée par des essais dans lesquels la transmission de virus sauvage au sein de groupes de porcs vaccinés est étudiée. La protection due à la vaccination doit être obtenue le plus rapidement possible et de préférence en moins de 2 semaines. Une protection rapide et fiable doit être, si possible, obtenue après une seule administration. Bien plus, il doit être vérifié que la contamination de truies gestantes vaccinées ne conduit pas à une infection transplacentaire et à la naissance de portées congénitalement infectées par le virus PPC. La durée de l'immunité doit être d'au moins 6 mois.

De nombreux vaccins marqués sont en développement et deux ont été enregistrés dans l'UE. Ceux-ci sont des vaccins sous-unités qui utilisent la glycoprotéine E2 du virus PPC comme immunogène et ont subi des

évaluations indépendantes (9, 32). La sous-unité E2 est produite sur cellules d'insecte infectées par un baculovirus génétiquement modifié, contenant le gène E2 du virus PPC. Ainsi les vaccins ne renferment aucun virus PPC et le baculovirus vecteur est chimiquement inactivé. Les préparations finies sont adjuvées avec des huiles minérales pour former une émulsion double (eau/huile/eau) ou simple (eau dans l'huile). Plusieurs études sur la capacité de ces vaccins à prévenir la transmission horizontale ou verticale ont donné des résultats contradictoires (3).

b) Épreuve discriminante d'accompagnement

L'épreuve sérologique d'accompagnement doit être très sensible car la vaccination va réduire la prévalence de la maladie. Idéalement, elle doit permettre la discrimination dans le délai nécessaire à l'apparition des anticorps dirigés contre la protéine immunisante et doit être utilisée surtout comme une épreuve au niveau des élevages. Si une forte sensibilité réduit la spécificité de l'épreuve, déjà compromise par la présence d'anticorps vis-à-vis d'autres pestivirus, de bons et rapides tests de confirmation doivent être disponibles pour différencier les résultats positifs des fausses réactions.

Les épreuves d'accompagnement DIVA pour les vaccins sous-unités E2 sont des épreuves ELISA dans lesquelles la détection des anticorps dépend de la protéine Erns (12, 16). De telles épreuves ont été récemment adoptées par la Commission européenne (2) dans le but de déterminer si des élevages, vaccinés avec le vaccin sous-unité E2, pouvaient avoir été exposés à un virus sauvage. Une évaluation de leur performance (12) a révélé qu'aucun ELISA discriminant n'a permis de détecter les porcs sevrés vaccinés avec un vaccin avec marqueur et éprouvés avec un virus de la PPC ; la recommandation est donc de n'utiliser cette stratégie que sur la base des élevages.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANON (2002). Commission decision of 1 February 2002 approving a Diagnostic Manual establishing diagnostic procedures, sampling methods and criteria for evaluation of the laboratory tests for the confirmation of classical swine fever (2002/106/EC). *Official Journal of the European Union*, L39/71.
2. ANON (2003). Commission decision of 5 December 2003 amending Decision 2002/106/EC as regards the establishment of a classical swine fever discriminatory test. (2003/859/EC). *Official Journal of the European Union*, L324/55.
3. BLOME S., MEINDL-BOHMER A., LOEFFEN W., THUER B. & MOENNIG V. (2006). Assessment of classical swine fever diagnostics and vaccine performance. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **25**, 1025–1038.
4. BOUMA A., STEGEMAN J.A., ENGEL B., DE KLUIJVER E.P., ELBERS A.R. & DE JONG M.C. (2001). Evaluation of diagnostic tests for the detection of classical swine fever in the field without a gold standard. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 383–388.
5. COLIJN E.O., BLOEMRAAD M. & WENSVOORT G. (1997). An improved ELISA for the detection of serum antibodies directed against classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, **59**, 15–25.
6. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (1997). The Use of Marker Vaccines in the Control of Infectious Diseases in Particular, Classical Swine Fever. Report Sci. Vet. Comm. Commission of the European Communities, DGVI, BII2, doc VI/8119, 1–13.
7. DEPNER K., GRUBER A. & LIESS B. (1994). Experimental infection of weaner pigs with a field isolate of HC/CSF virus derived from a recent outbreak in Lower Saxony. I: Clinical, virological and serological findings. *Wien. Tierarztl. Monatsschr.*, **81**, 370–373.
8. DEPNER K., PATON D.J., CRUCIERE C., DE MIA G.M., MULLER A., KOENEN F., STARK R. & LIESS B. (1995). Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid screening and detection of classical swine fever virus antigens in the blood of pigs. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **14**, 677–689.
9. 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.
10. DE SMIT A.J., TERPSTRA C. & WENSVOORT G. (1994). Comparison of Viral Isolation Methods from Whole Blood or Blood Components for Early Diagnosis of CSF. Rep. Meeting Nat. Swine Fever Lab. Brussels 24–25 November. Commission of the European Communities, DGVI/5848/95, 21–22.

11. EDWARDS S., MOENNIG V. & WENSVOORT G. (1991). The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses. *Vet. Microbiol.*, **29**, 101–108.
12. FLOEGEL-NIESMANN G. (2001). Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial III. Evaluation of discriminatory ELISAs. *Vet. Microbiol.*, **83**, 121–136.
13. HAVE P. (1987). Use of enzyme-linked immunosorbent assays in diagnosis of viral diseases in domestic livestock. *Arch. Experimentelle Veterinärmedizin*, **41**, 645–649.
14. HOFFMANN B., BEER M., SCHELP C., SCHIRMEIER H. & DEPNER K. (2005). Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J. Virol. Methods*, **130**, 36–44.
15. HURTADO A., GARCIA-PEREZ A.L., ADURIZ G. & JUSTE R.A. (2003). Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. *Virus Res.*, **92**, 67–73.
16. LANGEDIJK J.P., MIDDEL W.G., MELOEN R.H., KRAMPS J.A. & DE SMIT J.A. (2001). Enzyme-linked immunosorbent assay using a virus type-specific peptide based on a subdomain of envelope protein E(rns) for serologic diagnosis of pestivirus infections in swine. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 906–912.
17. LEFORBAN Y., EDWARDS S., IBATA G. & VANNIER P. (1990). A blocking ELISA to differentiate hog cholera virus antibodies in pig sera from those due to other pestiviruses. *Ann. Rech. Vet.*, **21**, 119–129.
18. LIESS B. & PRAGER D. (1976). Detection of neutralising antibodies (NIF) test: use of new technical equipment for laboratory swine fever diagnosis. *In*: CEC Seminar on Diagnosis and Epizootiology of Classical Swine Fever. EUR 5486, 187–197.
19. LIN M., TROTTIER E. & MALLORY M. (2005). Enzyme-linked immunosorbent assay based on a chimeric antigen bearing antigenic regions of structural proteins Erns and E2 for serodiagnosis of classical swine fever virus infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 877–881.
20. MCGOLDRICK A., LOWINGS J.P., IBATA G., SANDS J.J., BELAK S. & PATON D.J. (1998). A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (Taq Man). *J. Virol. Methods*, **72**, 125–135.
21. MOSER C., RUGGLI N., TRATSCHIN J.D. & HOFMANN M.A. (1996). Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2. *Vet. Microbiol.*, **51**, 41–53.
22. OGAWA N., NAKAGAWA H., YAMAMOTO H., SAWADA M., HANAKI T. & SAZAWA H. (1973). Viral detection in pigs inoculated with the GPE-strain of hog cholera attenuated virus. *Ann. Rep. Nat. Vet. Assay Lab. (Japan)*, **10**, 15–19.
23. PATON D.J., MCGOLDRICK A., GREISER-WILKE I., PARCHARIYANON S., SONG J.-Y., LIOU P.P., STADEJEK T., LOWINGS J.P., BJORKLUND H. & BELAK S. (2000). Genetic typing of classical swine fever. *Vet. Microbiol.*, **73**, 137–157.
24. PATON D.J., MCGOLDRICK A., BENSANDE E., BELAK S., MITTELHOLZER C., KOENEN F., VANDERHALLEN H., GREISER-WILKE I., SCHEIBNER H., STADEJEK T., HOFMANN M. & THUER B. (2000). Classical swine fever virus: a second ring test to evaluate RT-PCR detection methods. *Vet. Microbiol.*, **77**, 71–81.
25. RESSANG A.A. (1973). Studies on the pathogenesis of hog cholera. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **20**, 256–271.
26. 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** (1), 500–505.
27. RISATTI G., HOLINKA L., LU Z., KUTISH G., CALLAHAN J.D., NELSON W.M., BREA TIO E. & BORCA M.V. (2005). Diagnostic evaluation of a real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of classical swine fever virus. *J. Clin. Microbiol.*, **43** (1), 468–471.
28. TERPSTRA C. (1978). Detection of C-strain virus in pigs following vaccination against swine fever. *Tijdschr. Diergeneeskde*, **103**, 678–684.
29. TERPSTRA C., BLOEMRAAD M. & GIELKENS A.J.L. (1984). The neutralising peroxidase-linked assay for detection of antibody against swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, **9**, 113–120.

30. TERPSTRA C. & WENSVOORT G. (1988). The protective value of vaccine-induced neutralising antibody titres in swine fever. *Vet. Microbiol.*, **16**, 123–128.
31. TERPSTRA C. & WENSVOORT G. (1988). Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res. Vet. Sci.*, **45**, 137–142.
32. UTTENTHAL A., LE POTIER M.F., ROMERO L., DE MIA G.M. & FLOEGEL-NIESMANN G. (2001). Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial I. Challenge studies in weaner pigs. *Vet. Microbiol.*, **83**, 85–106.
33. VANNIER P. & CARNERO R. (1985). Effets pour le porc d'un virus propagé par un vaccin contre la maladie d'Aujeszky. *Point Vet.*, **17**, 325–331.
34. 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.
35. WENSVOORT G. & TERPSTRA C. (1988). Bovine viral diarrhoea infections in piglets born from sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. *Res. Vet. Sci.*, **45**, 143–148.
36. WENSVOORT G., TERPSTRA C., BOONSTRA J., BLOEMRAAD M. & VAN ZAANE D. (1986). Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet. Microbiol.*, **12**, 101–108.
37. WENSVOORT G., TERPSTRA C., DE KLUYVER E.P. (1989). Characterization of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralisation. *Vet. Microbiol.*, **20**, 291–306.
38. WENSVOORT G., TERPSTRA C., DE KLUYVER E.P., KRAGHTEN C. & WARNAAR J.C. (1989). Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. *Vet. Microbiol.*, **21**, 9–20.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence pour la peste porcine classique (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).

CHAPITRE 2.8.4.

ENCÉPHALITE DUE AU VIRUS NIPAH

Se reporter au Chapitre 2.9.6. Maladies dues aux virus hendra et nipah.

*
* *

BRUCELLOSE PORCINE

RÉSUMÉ

*La brucellose du porc due à *Brucella suis*, est une infection bactérienne qui, après une bactériémie initiale, induit des lésions inflammatoires chroniques des organes reproducteurs dans les deux sexes, avec une localisation occasionnelle à d'autres tissus. L'espèce *Brucella suis* comprend 5 biovars, mais l'infection du porc est due aux biovars 1, 2 ou 3 de *B. suis*. Les biovars 1 et 3 induisent une maladie identique. Le biovar 2 induit quant à lui une maladie différente quant à son spectre d'hôtes, sa distribution géographique limitée et sa pathogénie. Le biovar 2 est rarement pathogène pour l'homme, alors que les biovars 1 et 3 sont fortement pathogènes et sont à l'origine d'une maladie sévère. La brucellose porcine est très répandue ; sa prévalence est néanmoins faible, à l'exception de l'Amérique du Sud et l'Asie du Sud-Est où la prévalence est plus forte. Dans certaines régions, l'infection à *B. suis* s'est établie chez les sangliers ou les porcs sauvages – les méthodes de diagnostic recommandées dans ces espèces sont identiques à celles destinées au porc domestique. Plusieurs biovars de *B. suis* peuvent infecter d'autres espèces que les suidés, comme le renne, le caribou, le lièvre, diverses espèces de rongeurs, et occasionnellement les bovins et les chiens. Les infections à *Brucella suis* chez les animaux autres que le porc sont abordées dans l'annexe à la fin de ce chapitre.*

*La symptomatologie chez la truie inclut l'avortement à n'importe quel stade de la gestation ainsi que la naissance de porcelets mort-nés ou chétifs. Chez le mâle, le signe le plus évident est une orchite, mais les organes sexuels secondaires peuvent aussi être atteints. *Brucella suis* peut être présente dans le sperme, parfois en l'absence de signes cliniques. La transmission au cours de l'accouplement est plus fréquente que dans la brucellose des ruminants. Dans les deux sexes, les os, les articulations et les gaines tendineuses peuvent être touchés, induisant des boiteries, et parfois de véritables paralysies. Les porcs sont sensibles à l'infection expérimentale par *B. abortus* et *B. melitensis* mais la maladie naturelle liée à ces agents a été rarement rapportée. Chez l'homme, l'infection est généralement limitée aux personnes en contact professionnellement avec les porcs et aux personnels de laboratoire. *B. suis* est capable de coloniser la mamelle chez les bovins avec excrétion dans le lait, ce qui constitue un risque sanitaire potentiel très sérieux pour l'homme.*

Identification de l'agent pathogène : *Brucella suis* est aisément isolée chez le porc vivant par mise en culture des produits du part et sur les carcasses, par mise en culture de nœuds lymphatiques et d'organes. Des milieux sélectifs sont disponibles pour la culture à partir d'échantillons contaminés. *B. suis* est naturellement en phase lisse – l'aspect des colonies sur milieu solide est typique d'une *Brucella* lisse. Les biovars d'origine porcine agglutinent avec le sérum monospécifique anti-A, mais pas avec l'anti-M. L'identification définitive de l'espèce et du biovar peut être obtenue par la lysotypie couplée à divers tests biochimiques, lesquels sont préférentiellement mis en œuvre par des laboratoires spécialisés.

Épreuves sérologiques : *jusqu'à présent, aucune des épreuves sérologiques conventionnelles n'est véritablement fiables en diagnostic de routine au niveau individuel. Elles sont plutôt utilisées pour un diagnostic de cheptel. Les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) indirectes ou de compétition sont les épreuves prescrites pour les échanges internationaux. Les épreuves à l'antigène tamponné (EAT), c'est-à-dire le Rose Bengale (RB) et le BPAT (Buffered Plate Agglutination Test) sont suggérées comme épreuves alternatives pour le dépistage, de cheptels entiers notamment. Les protocoles pour les EAT sont les mêmes que ceux décrits au Chapitre 2.4.3., « Brucellose bovine ». Une épreuve de polarisation de fluorescence a également été*

développée. L'épreuve cutanée allergique à la brucelline est également utile pour l'identification des cheptels infectés.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : le vaccin « souche 2 » de *Brucella suis* a été utilisé pour l'immunisation des porcs en Rép. Populaire de Chine. Une confirmation des résultats obtenus en Chine est néanmoins nécessaire avant qu'on puisse recommander son utilisation. Des travaux expérimentaux ont par ailleurs montré la supériorité du vaccin Rev.1 sur le vaccin *Brucella suis* S2 pour la protection du mouton contre *B. melitensis*. Les données concernant le vaccin RB51 de *B. abortus* sont encore insuffisantes pour démontrer son efficacité dans la protection du porc contre une exposition à *B. suis*. En pratique, aucun produit n'est acceptable actuellement. La préparation, le contrôle et l'utilisation d'un allergène établi, « *Brucellysate* » (ou *Brucelline fraction F*) sont décrits.

A. INTRODUCTION

La brucellose porcine est une infection due aux biovars 1, 2 ou 3 de *Brucella suis*. Elle est présente dans de nombreux pays où le porc fait l'objet d'un élevage. En général, la prévalence est faible, mais dans certaines régions, comme en Amérique du Sud ou en Asie du Sud-Est, la prévalence est bien plus forte. La brucellose porcine serait un sérieux problème dans certains pays, même s'il n'est pas encore reconnu. Les infections liées au biovar 1 de *B. suis* ont été rapportées chez les porcs sauvages dans certains États du sud des États-Unis d'Amérique (USA) et au Queensland en Australie. Dans ces deux pays, on a rapporté un grand nombre d'infections humaines touchant des personnes chassant ou manipulant des produits issus de porcs sauvages (22, 25).

L'infection est généralement contractée par consommation de nourriture contaminée par les produits du part et/ou de l'avortement ou par les sécrétions utérines. Les porcs ingèrent volontiers les avortons et leurs membranes. La transmission lors de la saillie est également fréquente et ceci n'est pas sans conséquence pour l'insémination artificielle.

Chez le porc, comme chez les ruminants, *B. suis*, après une première phase de bactériémie, colonise les cellules du tractus génital dans les deux sexes. Chez la femelle, le placenta et les fœtus sont envahis. Chez le mâle, les organes suivants sont touchés : testicule, prostate, épидидyme, vésicules séminales et/ou glandes bulbo-urétrales (glandes de Cowper). Chez le mâle, les lésions, qui sont généralement unilatérales, débutent par une hyperplasie pouvant progresser vers la formation d'abcès ; le stade final est caractérisé par une sclérose et une atrophie. Des arthrites peuvent apparaître avec parfois une spondylite.

La manifestation classique de la brucellose chez la femelle est l'avortement, qui peut apparaître très précocement mais aussi à n'importe quel stade de la gestation. La décharge vaginale n'est pas souvent visible et les problèmes rapportés sont plutôt des infertilités que des avortements. Chez le mâle, la brucellose est souvent persistante, avec des lésions du tractus génital avec une incidence temporaire ou permanente sur l'activité sexuelle. Le verrat peut excréter des *Brucella* dans le sperme, sans anomalie apparente des organes sexuels ni incidence sur l'ardeur génésique.

Dans les deux sexes, on peut observer un gonflement des articulations et des gaines tendineuses, des boiteries et, occasionnellement, des paralysies postérieures. Une proportion importante des mâles et femelles guérit de l'infection, souvent dans les 6 mois, mais certains demeurent infectés de manière permanente.

La brucellose due au biovar 2 de *B. suis* diffère de celle dues aux biovars 1 et 3 dans son spectre d'hôtes, sa distribution et sa pathogénie. La répartition géographique du biovar 2 est historiquement constituée d'une large zone allant de la Scandinavie aux Balkans (2). La prévalence chez les sangliers semble être élevée dans toute l'Europe (1, 4, 11). Dans les foyers d'infection par le biovar 2 du porc de plein air, récemment observés en Europe, les sangliers sont considérés comme la source de l'infection (11). En plus du sanglier sauvage, le lièvre brun européen (*Lepus capensis*) est également un réservoir du biovar 2 de *B. suis* et est considéré comme une source possible pour l'élevage domestique (2, 13). Le biovar 2 de *B. suis* induit des lésions miliaries à purulentes des organes, notamment des organes reproducteurs. Jusqu'à présent, les cas de brucellose humaine due au biovar 2 n'ont été que rarement signalés. Cependant, une infection par le biovar 2 a été rapportée chez deux chasseurs immuno-déprimés, qui avaient été largement exposés lors du dépeçage et de l'éviscération de sangliers ou de lièvres (12).

Les biovars courants de *B. suis* (1 et 3) sont des agents pathogènes sérieux pour l'homme et des précautions doivent être prises pour la manipulation et l'élimination des produits potentiellement infectieux. Ceci est particulièrement vrai pour le laboratoire où la mise en culture amplifie le risque. Aussi, les manipulations au laboratoire de cultures ou de produits contaminés provenant d'animaux infectés doivent-elles être effectuées en conditions strictes de biosécurité pour se protéger de cet agent zoonotique dangereux. On recommande ainsi un niveau 3 ou supérieur de sécurité biologique, tel que décrit au Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries »).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

En ce qui concerne les biovars 1 et 3, les méthodes de culture sont au moins aussi sensibles que la sérologie (6). Le biovar 2 semble particulièrement sensible aux milieux sélectifs et pourrait donc se révéler plus difficile à isoler (Garin-Bastuji et Blasco, résultats non publiés). Dans la mesure où les produits de l'industrie porcine passent presque tous en abattoir, des méthodes de surveillance (sérologie et culture) peuvent être appliquées efficacement à ce niveau. Dans de nombreuses régions, l'élevage porcin familial traditionnel est maintenant accompagné par le développement de plus grandes unités commerciales, impliquant une utilisation accrue de l'insémination artificielle. Alors que l'insémination artificielle à partir de verrats indemnes de brucellose est d'un apport important dans le contrôle de la brucellose porcine, l'utilisation malencontreuse de sperme contaminé peut à l'inverse causer des dommages incalculables.

1. Identification de l'agent pathogène

Les prélèvements de choix pour la bactériologie et leur traitement sont semblables à ceux décrits au Chapitre 2.4.3, « Brucellose bovine ». Les milieux de base et les milieux sélectifs utilisés pour les autres espèces de *Brucella* conviennent à *B. suis* (voir le Chapitre 2.4.3.). L'addition de sérum n'est pas indispensable, mais un milieu de base contenant 5 % de sérum convient tant pour l'isolement que pour l'entretien des cultures et le typage. L'addition de CO₂ à l'atmosphère d'incubation n'est pas nécessaire.

Brucella suis est naturellement en phase lisse et les colonies sont en tout point semblables à celles des autres *Brucella* lisses, décrites au Chapitre 2.4.3.

Les biovars 1, 2 et 3 de *B. suis* ont tous un antigène majeur de surface de type A, et leur identification présomptive peut être réalisée par l'agglutination des colonies par le sérum monospécifique anti-A. L'identification définitive de l'espèce et du biovar doit être réalisée par un Laboratoire de référence spécialisé. Les Laboratoires de référence de l'OIE sont donnés dans la liste en partie 3 de ce *Manuel terrestre*.

La confirmation de l'espèce et du biovar est permise par la mise en œuvre des tests de lysotypie, de production d'H₂S (seul le biovar 1 en produit), et de croissance en présence de colorants. Certaines souches du biovar 1 de *B. suis* sont atypiques et poussent sur un milieu renfermant 20 µg/ml de fuchsine basique. La plupart des souches de *B. suis* sont inhibées par la safranine O à la concentration du 1/10 000 et *B. suis* réagit plus rapidement que *B. abortus* et *B. melitensis* au test de l'uréase. Les tests de mesure du métabolisme oxydatif permettent également la différenciation de *B. suis* des autres espèces de *Brucella* lisses.

Des techniques moléculaires, utilisant la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) et des amorces spécifiques, sont disponibles et permettent la distinction de *B. suis* des autres espèces de *Brucella* lisses (3, 24). Cependant, ces techniques ne permettent pas la distinction des biovars entre eux et n'ont pas été complètement validées ni normalisées. La séquence complète de 3,3 Mb du génome de la souche 1330 de *B. suis* a été déterminée. Sa structure chromosomique et le contenu génomique sont similaires à ceux de la souche 16M de *B. melitensis* (20) et de la souche 9-941 de *B. abortus* (15). La connaissance de la séquence génomique a été d'un grand intérêt pour les recherches fondamentales sur la taxonomie, les cycles métaboliques et la virulence de *B. suis* et peut s'avérer utile pour le développement de nouvelles épreuves de diagnostic ou de nouveaux vaccins.

2. Épreuves sérologiques

Aucune des épreuves sérologiques classiques utilisées pour le diagnostic de la brucellose porcine n'est fiable au niveau individuel. Les porcs sevrés de 2 à 3 mois, notamment, ne développent qu'une très faible réponse sérologique alors qu'ils sont parfaitement sensibles à l'infection par *B. suis*.

Ces épreuves sérologiques classiques reposent sur des antigènes du lipopolysaccharide lisse (LPS). De tels antigènes, réagissent également avec les anticorps dirigés contre LPS de *Yersinia enterocolitica* O:9, du fait de la communauté antigénique de la chaîne « O » polysaccharidique et ne peuvent différencier les anticorps des deux infections. L'infection à *Yersinia enterocolitica* O:9 du porc n'est pas rare dans certaines régions (1, 28).

Divers travaux ont suggéré que les sensibilités et spécificités de l'épreuve « *Buffered Acidified Plate Antigen Assay* », de l'épreuve au 2-mercaptoéthanol, des méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) indirect (I-ELISA) et de compétition (C-ELISA) ou de l'épreuve de polarisation de fluorescence (FPA) sont similaires (19). Il a été signalé que l'utilisation de la FPA (17) et du C-ELISA élimine les réactions croisées avec *Y. enterocolitica*, mais il conviendrait de vérifier cette affirmation par d'autres études de terrain réalisées dans des conditions épidémiologiques variées. Les sérums porcins peuvent également contenir des anticorps non-spécifiques, supposés être des IgM, ce qui réduit encore la spécificité de la sérologie classique, notamment l'épreuve de séro-agglutination lente (SAT). De plus, le complément porcine interagit avec le complément de cobaye et produit une activité anti-complémentaire qui réduit la sensibilité du test de fixation du complément (FC). Des sensibilités aussi faibles que 38 % (21) ou 49 % (23) ont été rapportées pour la FC ; aussi, n'est-il pas possible de recommander ce test pour le diagnostic individuel de la brucellose porcine. Pour les échanges internationaux et le commerce en général, l'achat de verrats notamment, le statut sanitaire du cheptel et la zone dans laquelle est situé le cheptel sont ainsi plus importants que les tests individuels. Bien que les tests sérologiques pour la brucellose porcine soient à utiliser sur la base du troupeau, la réglementation dans certains pays continue d'exiger que seuls les porcs dont le sérum donne un titre inférieur à 30 Unités Internationales (UI) par ml en séro-agglutination et un titre en FC de moins de 20 UIFC (Unités internationales de FC), puissent franchir les frontières internationales.

- **Sérums étalons de référence**

Les sérums étalons (de référence) primaires sont ceux par rapport auxquels tous les autres étalons doivent être comparés et calibrés. Ces étalons sont en cours de développement et seront disponibles pour les laboratoires nationaux de référence lorsqu'ils seront validés. Des réactifs biologiques pour le C-ELISA et l'I-ELISA sont disponibles en petites quantités à des fins de recherche ou de normalisation¹.

a) Méthodes immuno-enzymatiques (Épreuves prescrites pour les échanges internationaux)

- **ELISA Indirect**

Des ELISA indirects ou de compétition ont été développés pour le diagnostic individuel et pour le dépistage de grands nombres d'échantillons de sérums. Ces techniques promettent d'être plus efficaces que toutes les autres épreuves mentionnées plus haut, et le C-ELISA semble meilleur pour la différenciation entre les réponses anticorps liées à une infection par *Y. enterocolitica* O:9 et celles dues à une infection par *Brucella*. Une méthode d'I-ELISA est décrite en détail au Chapitre 2.4.3. Un anticorps monoclonal spécifique des IgG porcines conjugué à la peroxydase de raifort peut cependant également être utilisé.

- **ELISA de compétition**

Les procédures de C-ELISA pour la détection des anticorps porcins contre *Brucella* sp. (17) sont identiques à celles décrites pour les anticorps bovins contre *B. abortus* au Chapitre 2.4.3. Ce test est capable d'éliminer la plupart des réactions dues à *Y. enterocolitica* O:9 et, dans certains cas, d'autres anticorps présentant des réactions croisées, tels que les IgM, qui sont moins compétitifs. Le C-ELISA est recommandé comme test de confirmation car sa sensibilité et sa spécificité sont supérieures à celles des épreuves d'agglutination.

b) Épreuve de polarisation de fluorescence (Épreuve alternative pour les échanges internationaux)

Le FPA utilisé pour la détection des anticorps porcins contre *Brucella* sp. est à peu près identique à celui décrit pour les bovins (pour plus de détails voir le Chapitre 2.4.3.) ; des exemples de dilution sont 1/25 pour l'épreuve en tube et de 1/10 pour celle en plaque (17). C'est une technique simple pour la mesure des interactions antigène/anticorps et qui peut être mise en œuvre au laboratoire comme sur le terrain. Cette épreuve peut aider à éliminer une grande partie de la réactivité liée aux expositions à *Y. enterocolitica* O:9 et d'autres anticorps présentant des réactions croisées. Les sérums lyophilisés ont tendance à augmenter le bruit de fond dans cette épreuve. Le FPA peut être utilisé comme épreuve de dépistage et/ou comme épreuve de confirmation.

c) Épreuves à l'antigène tamponné de *Brucella* (Épreuve alternative pour les échanges internationaux)

Les épreuves à l'antigène tamponné de *Brucella* (BBAT), c'est-à-dire le card test, l'épreuve à l'antigène tamponné ou Rose Bengale (EAT) ou le « *Buffered Plate Agglutination Test* » (BPAT), sont recommandés comme épreuves alternatives pour le dépistage, de cheptels entiers notamment. La préparation et la normalisation des antigènes de BBAT et les procédures de mise en œuvre des épreuves sont décrites au Chapitre 2.4.3. Tous les biovars de *B. suis* touchant les porcins ont le même antigène A immuno-dominant,

¹ Disponible auprès du Laboratoire de référence de l'OIE pour la Brucellose : Animal Diseases Research Institute, 3851 Fallowfield Road, Nepean, Ontario K2H 8P9, Canada.

comme la plupart des biovars de *B. abortus*. Les antigènes de *B. abortus* sont donc appropriés pour tester les sérums porcins.

3. Autres épreuves

a) Épreuves cutanées allergiques (hypersensibilité)

La Brucellin-INRA est un extrait du LPS de la souche B115 de *B. melitensis* en phase rugueuse. Cette préparation n'induit pas l'apparition d'anticorps qui pourraient réagir dans les épreuves à l'antigène tamponné, la fixation du complément ou les ELISA. Le produit a été mis au point pour être utilisé chez les bovins, mais il permet aussi le diagnostic de la brucellose porcine au niveau du troupeau. Comme une souche rugueuse est utilisée pour sa préparation, on évite ainsi la présence de LPS lisse. La préparation, la normalisation et les contrôles de la Brucellin-INRA sont décrits en détail dans le Chapitre 2.4.3. Dans le cadre du test diagnostic, l'allergène est utilisé chez les porcs à la dose de 0,1 ml en injection intradermique à la base de l'oreille, ou mieux sur le côté de la queue. Ce site semble en effet plus pratique et moins dangereux. La réaction est lue après 48 h. Une réaction positive se manifeste par un érythème sur la peau non-pigmentée et par un épaissement œdémateux. Lors de fortes réactions, on peut aussi observer une nécrose.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

On compte de nombreuses tentatives de développement d'un vaccin permettant d'immuniser les porcs contre *B. suis*. Un seul produit a été considéré comme acceptable pour une utilisation sur le terrain – la souche S2 de *B. suis* a été utilisée largement dans le sud de la Rép. Populaire de Chine (16, 29)². À ce jour, il ne semble pas avoir été utilisé ailleurs sur le porc, probablement du fait de la protection plus faible qu'il confère au mouton contre l'infection à *B. melitensis* en comparaison avec le vaccin Rev.1 (27). Les données ne sont par ailleurs pas suffisantes actuellement pour conclure à l'efficacité du vaccin RB51 de *B. abortus* dans la protection des porcins contre une exposition à *B. suis*.

ANNEXE : INFECTIONS À BRUCELLA SUIIS DANS LES ESPÈCES ANIMALES AUTRES QUE LE PORC

1. Brucellose du Renne

Le biovar 4 de *B. suis* est à l'origine d'une maladie sérieuse chez le renne et le caribou (*Rangifer tarandus* et ses diverses sous-espèces) sur l'ensemble de la région arctique, en Sibérie, Canada et Alaska (18). Certains de ces animaux sont domestiqués, d'autres sont sauvages et migrants. *Rangifer tarandus* est particulièrement sensible à l'infection par *B. suis*, qui cause, dans cette espèce, de la fièvre, une asthénie et divers signes locaux, tels qu'avortement, rétention placentaire, métrite, avec parfois une décharge vaginale sanguinolente, mammites, bursites et orchites. En région arctique, *B. suis* biovar 4 induit des infections sévères chez l'homme (7). La transmission à l'homme peut être directe par contact ou par consommation de lait et autres produits du renne insuffisamment chauffés. La moelle osseuse, qui est considérée comme un mets délicat dans cette région, est également une source d'infection pour l'homme.

Les méthodes précédemment décrites pour l'isolement et l'identification de *B. suis* à partir des prélèvements porcins sont applicables pour *B. suis* biovar 4 à partir de prélèvements de renne. Le biovar 4 pousse bien sur tous les milieux usuels pour la culture des *Brucella*. Il agglutine les deux sérums monospécifiques anti-A et -M. Pour la sérologie, l'agglutination en tubes a été décrite comme satisfaisante, le seuil de positivité se situant à la dilution du 1/20. Le test de FC a également été utilisé, mais le mode d'interprétation chez le renne n'a pas été défini.

La vaccination du renne au moyen du vaccin *B. abortus* B19 ou du vaccin adjuvé *B. abortus* 45/20 ont fait l'objet d'essais expérimentaux. Dans le cas du B19, la réaction au vaccin est plutôt sévère et l'immunité n'est réelle que pour de très faibles doses de *B. suis* biovar 4. Gall *et al.* (8) ont comparé plusieurs épreuves sérologiques et ont trouvé que les valeurs de spécificité du BPAT et de la FC étaient plus faibles chez le renne/caribou que celle de l'ELISA, du C-ELISA et du FPA, alors que la sensibilité était analogue pour toutes les épreuves.

2 Disponible auprès du National Institute for the Control of Veterinary Products and Pharmaceuticals, Ministry of Agriculture, 30 Baishiqiao Road, Beijing 100081, Chine (Rép. Populaire de), ou auprès de VLA Weybridge, New Haw, Addlestone,

2. Infection par *Brucella suis* dans d'autres espèces non porcines

Différents types de situations épidémiologiques peuvent se présenter concernant l'infection par *B. suis* des autres espèces non porcines. Dans un premier cas, l'infection à *B. suis* concerne des animaux qui ne sont pas ses hôtes naturels spécifiques et qui s'infectent par ingestion de produits contaminés ou par cohabitation avec les hôtes naturels infectés. Par exemple les renards et loups de l'Arctique peuvent contracter une infection à *B. suis* biovar 4 à partir des rennes ; les chiens et les rongeurs, rats et souris par exemple, peuvent également s'infecter avec d'autres biovars de *B. suis* par cohabitation avec les hôtes naturels infectés. Les bovins et les chevaux peuvent s'infecter auprès de porcs infectés du fait d'une cohabitation ou d'une simple interaction (5). Les bactéries infectantes correspondent invariablement aux biovars parfaitement décrits pour l'espèce hôte naturelle.

Dans un second cas, ce sont des espèces sauvages, hôtes naturels de *B. suis*, qui s'infectent. Un exemple en est la brucellose dite murine dans l'ex-URSS, où de petits rongeurs sont infectés par le biovar 5 de *B. suis*. D'autres situations semblables ont été rapportées en Australie au Queensland ou au Kenya. Dans les 3 cas, les souches de *B. suis* impliquées présentaient des caractéristiques différentes et au moins l'une d'elles était difficile à classer.

La brucellose due à *B. suis* biovar 2 est sans doute un cas particulier. La répartition géographique du biovar 2 est historiquement constituée d'une large zone allant de la Scandinavie aux Balkans. Le réservoir de l'infection est le sanglier sauvage (*Sus scrofa*) (1, 5, 11, 13, 14) ou le lièvre brun européen (*Lepus capensis*) (26) voire les deux espèces. Les porcs domestiques élevés en plein air de cette zone sont exposés à un risque élevé de contamination par le biovar 2 à partir du réservoir sauvage. Après entrée dans les élevages de porcs domestiques, le biovar 2 peut s'étendre aussi rapidement que les biovars 1 et 3. La maladie chez le lièvre se caractérise par la formation de nodules, d'une taille allant de celle d'une graine de millet à celle d'une cerise, voire plus gros. De tels nodules, qui ont tendance à devenir purulents, peuvent être localisés un peu partout sur le corps de l'animal. Parfois sous-cutanés ou intramusculaires, ils peuvent aussi concerner le foie, le poumon ou l'appareil génital dans les deux sexes. L'aspect général du cadavre de lièvre est étonnamment peu affecté. D'autres espèces peuvent aussi se contaminer lors de contact étroit avec des porcs, des sangliers ou des lièvres infectés. L'éviscération et le dépeçage de sanglier dans les étables pourrait être une occasion de transmission aux bovins (10).

Des enquêtes de surveillance sérologique sont régulièrement menées dans les espèces non porcines. Dans de telles enquêtes, la spécificité des épreuves utilisées prime sur la sensibilité. Aussi le test de FC est-il recommandé, bien que le BPAT soit utile du fait de sa simplicité de réalisation. Dans de nombreuses enquêtes anciennes, on a utilisé la séro-agglutination en tubes, apparemment avec satisfaction. L'ELISA indirect apparaît très utile pour les enquêtes épidémiologiques chez les sangliers car il est plus sensible et plus spécifique que le test au rose bengale ou la réaction de FC. Ce test a aussi été utilisé avec des échantillons de sang de mauvaise qualité tels que les prélèvements d'animaux sauvages. Quand ces prélèvements de mauvaise qualité sont testés avec d'autres techniques, les résultats peuvent être ne pas être interprétables. Un autre avantage de l'ELISA est qu'en l'absence de sérum, il est possible de réaliser le test sur des prélèvements de viande (9). Cependant dans les espèces non porcines, l'interprétation des résultats sérologiques peut poser problème. Lors de résultats supposés positifs, les enquêtes sérologiques doivent donc être complétées par des investigations bactériologiques.

Dans de telles situations, où par ailleurs l'agent infectieux peut présenter des caractéristiques inhabituelles, on recommande de doubler la culture sur milieu sélectif, par un ensemencement sur milieux ordinaires additionnés de 5 % de sérum et d'incuber ces cultures à la fois en atmosphère normale et en atmosphère contenant 10 % de CO₂. Les colonies évocatrices peuvent être pré-identifiées par coloration de Gram, agglutination sur lame par les sérums monospécifiques anti-A et -M et sérum anti-*Brucella* R (voir le Chapitre 2.4.3.). Le biovar 5 de *B. suis* est inhabituel car il réagit avec le sérum monospécifique anti-M mais pas avec le sérum anti-A. L'identification complète est, de préférence, réalisée par un laboratoire spécialisé.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AL DAHOUK S., NOCKLER K., TOMASO H., SPLETTSTOESSER W.D., JUNGENSEN G., RIBER U., PETRY T., HOFFMANN D., SCHOLZ H.C., HENSEL A. & NEUBAUER H. (2005). Seroprevalence of brucellosis, tularaemia, and yersiniosis in wild boars (*Sus scrofa*) from north-eastern Germany. *J. Vet. Med. [B]. Infect. Dis. Vet. Public Health*, **22**, 444–455.
2. ALTON G.G. (1990). *Brucella suis*. In: Animal Brucellosis. Nielsen K. & Duncan J.R., eds. CRC Press, Boston, USA.

3. BRICKER B.J. & HALLING S.M. (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2660–2666.
4. CVETNIC Z., MITAK M., OCEPEK M., LOJKIC M., TERZIC S., JEMERSIC L., HUMSKI A., HABRUN B., SOSTARIC B., BRSTILO N., KRT B. & GARIN-BASTUJI B. (2003). Wild boars (*Sus scrofa*) as reservoirs of *Brucella suis* biovar 2 in Croatia. *Acta Vet. Hung.*, **51**, 465–473.
5. CVETNIC Z., SPICIC S., CURIC S., JUKIC B., LOJKIC M., ALBERT D., THIÉBAUD M. & GARIN-BASTUJI B. (2005). Isolation of *Brucella suis* biovar 3 from horses in Croatia. *Vet. Rec.*, **156**, 584–585.
6. FERRIS R.A., SCHOENBAUM M.A. & CRAWFORD R.P. (1995). Comparison of serologic tests and bacteriologic culture for detection of brucellosis in swine from naturally infected herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **207**, 1332–1333.
7. FORBES L.B. (1991). Isolates of *B. suis* biotype 4 from animals and humans in Canada, 1982–1990. *Can. Vet. J.*, **32**, 686–688.
8. GALL D., NIELSEN K., FORBES L., COOK W., LECLAIR D., BALSEVICIUS S., KELLY L., SMITH P. & MALLORY M. (2001). Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. *J. Wildl. Dis.*, **37**, 110–118.
9. GARIN-BASTUJI B., CAU C., HARS J., BOUÉ F. & TERRIER M.E. (2004). Utilisation comparée du sérum, du poumon et du muscle pour le dépistage de la brucellose chez les sangliers. *Epidémiol. Santé Anim.*, **45**, 13–23.
10. GARIN-BASTUJI B. & DELCUEILLERIE F. (2001). Les brucelloses humaine et animales en France en l'an 2000. Situation épidémiologique – Programmes de contrôle et d'éradication. *Méd. Mal. Infect.*, **31** Suppl 2, 202–216.
11. GARIN-BASTUJI B., HARS J., CALVEZ D., THIÉBAUD M. & ARTOIS M. (2000). Brucellose du porc domestique et du sanglier sauvage due à *Brucella suis* biovar 2 en France. *Epidémiologie & Santé Animale*, **38**, 1–5.
12. GARIN-BASTUJI B., VAILLANT V., ALBERT D., TOURRAND B., DANJEAN M.P., LAGIER A., RISPAL P., BENQUET B., MAURIN M., DE VALK H. & MAILLES A. (2006). Is brucellosis due the biovar 2 of *Brucella suis* an emerging zoonosis in France? Two case reports in wild boar and hare hunters. In: Proceedings of the International Society of Chemotherapy Disease Management Meeting, 1st International Meeting on Treatment of Human Brucellosis, 7–10 November 2006, Ioannina, Greece.
13. GODFROID J. & KASBOHRER A. (2002). Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Vet. Microbiol.*, **90**, 135–145.
14. GODFROID J., MICHEL P., UYTTERHAEGEN L., DE SMEDT C., RASSENEUR F., BOELAERT F., SAEGERMAN C. & PATIGNY X. (1994). Brucellose enzootique a *Brucella suis* biotype 2 chez le sanglier (*Sus scrofa*) en Belgique. *Ann. Med. Vet.*, **138**, 263–268.
15. HALLING S.M., PETERSON-BURCH B.D., BRICKER B.J., ZUERNER R.L., QING Z., LI L.-L., KAPUR V., ALT D.P. & OLSEN S.C. (2005). Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.*, **187**, 2715–2726.
16. LIANG XINGXIAN (1991). The prevalence, prevention and control of swine brucellosis in Guangdong Province, China. Document AGU/BRU/92/21 Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.
17. NIELSEN K., GALL D., SMITH P., VIGLIOCCO A., PERREZ B., SAMARTINO L., 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**, 245–253.
18. ORLOW E.S. (1963). Brucellosis in reindeer. Proceedings of the 17th World Veterinary Congress, Hanover, Germany, 1, 585–588.
19. PAULO P.S., VIGLIOCCO A.M., RAMONDINO R.F., MARTICORENA D., BISSI E., BRIONES G., GORCHS C., GALL D. & NIELSEN K. (2000). Evaluation of primary binding assays for presumptive serodiagnosis of swine brucellosis in Argentina. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **7**, 828–831.

20. PAULSEN I.T., SESHADRI R., NELSON K.E., EISEN J.A., HEIDELBERG J.F., READ T.D., DODSON R.J., UMayAM L., BRINKAC L.M., BEANAN M.J., DAUGHERTY S.C., DEBOY R.T., DURKIN A.S., KOLONAY J.F., MADUPU R., NELSON W.C., AYODEJI B., KRAUL M., SHETTY J., MALEK J., VAN AKEN S.E., RIEDMULLER S., TETTELIN H., GILL S.R., WHITE O., SALZBERG S.L., HOOVER D.L., LINDLER L.E., HALLING S.M., BOYLE S.M. & FRASER (2002). The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13148–13153.
21. PRIADI A., CHASANAH U., HIRST R.G., EMMINS J.J., VAN DER GIESSEN J. & SEOROSO M. (1995). Development of an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for detecting antibody to *Brucella suis* in porcine sera. *Penyakit Hewan*, **17**, 66–70 (*Vet. Bull.*, **56**, abstract 7528).
22. ROBSON J.M., HARRISON M.W., WOOD R.N., TILSE M.H., MCKAY A.B. & BRODRIBB T.R. (1993). Brucellosis: reemergence and changing epidemiology in Queensland. *Med. J. Aust.*, **159**, 153–158.
23. ROGERS R.J., COOK D.R., KETTERER P.J., BALDRODCK, F.C., BLACKALL P.J. & STEWART R.W. (1989). An evaluation of three serological tests for antibody to *Brucella suis* in pigs. *Aust. Vet. J.*, **66**, 77–80.
24. SIFUENTES-RINCON A.M., REVOL A. & BARRERA-SALDANA H.A. (1997). Detection and differentiation of the six *Brucella* species by polymerase chain reaction. *Mol. Med.*, **3**, 734–739.
25. STARNES C.T., TALWANI R., HORVATH J.A., DUFFAS W.A., & BRYAN C.S. (2004). Brucellosis in two hunt club members in South Carolina. *JSC Med. Assoc.*, **100**, 113–115.
26. SZULOWSKI K., IWANIAK W., PILASZEK J., TRUSZCZYNSKI M. & CHROBOCINSKA M. (1999). The ELISA for the examination of hare sera for anti-*Brucella* antibodies. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **22**, 33–40.
27. VERGER J.M., GRAYON M., ZUNDEL E., LECHOPIER P. & OLIVER-BERNARDIN V. (1995). Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev.1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine*, **13**, 191–196.
28. WRATHALL A.E., BROUGHTON E.S., GILL K.P.W. & GOLDSMITH G.P. (1983). Serological reactions to *Brucella* species in British pigs. *Vet. Rec.*, **132**, 449–454.
29. XIE XIN (1986). Orally administrable brucellosis vaccine: *Brucella suis* strain 2 vaccine. *Vaccine*, **4**, 212–216.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la brucellose porcine (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).

CHAPITRE 2.8.6.

CYSTICERCOSE PORCINE

Se reporter au Chapitre 2.9.5. Cysticercoses.

*
* *

SYNDROME DYSGÉNÉSIQUE ET RESPIRATOIRE DU PORC

RÉSUMÉ

Le syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP) est caractérisé par des troubles de la reproduction chez les truies et des problèmes respiratoires chez les porcelets ainsi que les porcs en croissance. La maladie est causée par le virus SDRP, un virus actuellement classé dans l'ordre des Nidovirales, dans la famille des Arteriviridae et le genre Arterivirus. La principale cellule-cible du virus est le macrophage alvéolaire du porc. Il existe deux principaux types antigéniques du virus, le type européen et le type nord-américain. Le virus est essentiellement transmis par des porcs infectés mais aussi par les fèces, l'urine, la semence et le fumier.

Le SDRP est présent dans la grande majorité des régions productrices de porcs à travers le monde. Les problèmes reproducteurs sont caractérisés par de l'infertilité, une momification des fœtus en fin de gestation, des avortements, de la mortinatalité et par la mise bas de porcelets chétifs qui souvent mourront tôt après la naissance suite à des troubles respiratoires et des infections secondaires. Les porcs en croissance peuvent développer des signes modérés de la maladie respiratoire, en général compliquée par des infections secondaires. Aucune autre espèce n'est connue pour être infectée naturellement par le virus SDRP.

Identification de l'agent pathogène : *le diagnostic virologique de l'infection par le virus SDRP est difficile ; le virus peut être isolé de différents tissus ou organes provenant des porcs atteints, tels le sérum, les liquides d'ascite, les poumons, les amygdales, les nœuds lymphatiques et la rate. Puisque les macrophages alvéolaires porcins constituent le système de culture le plus sensible pour l'isolement du virus de l'un ou l'autre type antigénique, l'utilisation de ces cellules pour l'isolement viral est recommandée. Les cellules MARC-145 (un clone de la lignée MA-104) conviennent également. Il existe une variabilité entre les lots de macrophages quant à leur sensibilité au virus SDRP. Il est donc nécessaire d'identifier d'abord un lot de macrophages ayant une sensibilité élevée et de le conserver dans l'azote liquide jusqu'à l'utilisation. L'identification et la caractérisation du virus s'effectuent par une coloration immunologique utilisant des antisérums spécifiques. D'autres techniques ont également été développées pour la confirmation en laboratoire de l'infection par le virus SDRP, notamment l'immunohistochimie et l'hybridation in situ effectuées sur des tissus fixés, ainsi que la transcription inverse suivie de l'amplification en chaîne par polymérase.*

Épreuves sérologiques : *une grande variété d'épreuves sérologiques est actuellement disponible pour la détection des anticorps sériques contre le virus SDRP. L'épreuve d'immunopéroxydase sur monocouche cellulaire est réalisée sur des macrophages alvéolaires, habituellement infectés par le virus de type européen, et l'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) est réalisée sur les cellules MARC-145, habituellement infectées par le virus de type nord-américain. Ces deux épreuves peuvent toutefois être élaborées en utilisant des cellules et les deux types de virus. Des méthodes immuno-enzymatiques (ELISA), commerciales ou propres aux laboratoires, sont maintenant souvent utilisées. Il existe un test ELISA commercial qui est spécifique pour les deux types de virus, européen et nord-américain. Un ELISA indirect, un ELISA de blocage et un double ELISA permettant de différencier les réactions sérologiques aux types européen et nord-américain, ont été décrits.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *les vaccins peuvent être utiles pour la prévention des formes reproductrice et respiratoire du SDRP.*

Les vaccins vivants atténués ne sont pas appropriés pour la vaccination des truies et des cochettes gestantes ni pour les verrats. La vaccination peut entraîner l'excrétion du virus vaccinal dans la semence. Les vaccins de virus vivant atténué peuvent persister chez les animaux vaccinés, et la transmission aux animaux non vaccinés ainsi que l'apparition subséquente de la maladie causée par la souche vaccinale ont été rapportées.

A. INTRODUCTION

Le syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP) est caractérisé par des problèmes reproducteurs chez les truies et une maladie respiratoire chez les porcs (2). La maladie est apparue en 1987 aux États-Unis et a entraîné une pandémie en quelques années. Le SDRP est dû au virus SDRP. Il a été isolé en 1991 aux Pays-Bas (33) et est classé comme membre de l'ordre des Nidovirales, famille des Arteriviridae, genre *Arterivirus* (4). Le virus du SDRV est un virus à ARN, simple brin, de polarité positive, et sa biologie a été bien caractérisée. Peu après la découverte du virus, il est apparu que les isolats nord-américains (NA) et européens (EU) du virus du SDRV constituaient deux génotypes aux caractéristiques antigéniques différentes (20, 25, 32). Des recherches complémentaires ont mis en évidence des différences régionales au sein de chaque continent. Ces différences ont tendance à s'estomper depuis que des virus de type nord-américain ont été introduits en Europe (par le biais de vaccin à virus vivants produits à partir d'isolats nord-américains) et que des virus de type européen ont été retrouvés en Amérique du Nord. La plupart des virus du SDRV isolés en Amérique du Sud et en Asie sont du type nord-américain ; il est généralement admis que ces virus ont été introduits par les transports de porcs et/ou de semence.

La diversité s'accroît parmi les souches des deux génotypes ; cette diversité est attribuée au taux élevé d'erreurs lors de la réplication des virus du SDRV (5), et à la recombinaison entre les souches (28). Récemment, des souches ayant un haut degré de polymorphisme ont été décrites, ce qui a apporté des éclaircissements sur l'émergence d'agents pathogènes de porcs relativement nouveaux (26). Les effets de cette diversité sur le diagnostic et les vaccins sont mal connus et devraient être pris en considération.

Le syndrome reproductif est caractérisé par des avortements tardifs avec fœtus momifiés et par la naissance de porcelets mort-nés ou de porcelets chétifs. Une augmentation des retours en œstrus (repeat breeders) pendant la phase aiguë d'une épizootie est fréquemment signalée. Moins fréquemment des échecs de la reproduction en début ou au milieu de la gestation sont également constatés. Chez les verrats, les cochettes de remplacement et les truies, une fièvre passagère et de l'anorexie peuvent être observées. Le syndrome respiratoire est caractérisé par de la dyspnée, de la fièvre, de l'anorexie et de l'abattement. Les jeunes porcs sont plus fréquemment affectés que les vieux animaux, et les verrats ou les truies présentent fréquemment des formes asymptomatiques. Les infections secondaires sont de plus en plus fréquentes et la mortalité peut être élevée. Chez les verrats infectés par le virus SDRP et ceux qui ont été vaccinés avec le vaccin vivant atténué, le virus peut être excrété dans la semence, et des modifications dans la morphologie et la fonction spermatique ont été décrites (7). Le virus est transmis essentiellement directement par des porcs infectés mais aussi par les fèces, l'urine et le sperme. Il peut aussi être transmis indirectement, vraisemblablement par des aérosols ou des vecteurs mécaniques. Les lésions macroscopiques et les microscopiques en relation avec l'infection par le virus SDRP ont été largement décrites (13). En général, ces lésions sont plus sévères chez les jeunes animaux que chez les plus âgés. Des observations de terrain et des études expérimentales laissent à penser que des différences de virulence existent entre les isolats de virus SDRP, tant au sein d'un génotype qu'entre les génotypes (13). En dépit des nombreux résultats de la recherche depuis la découverte du virus, il existe encore de nombreuses zones d'ombre en ce qui concerne les relations entre le virus SDRP et les autres maladies, ainsi que la réponse immunitaire.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

L'identification du virus SDRP peut être réalisée par isolement, par détection des acides nucléiques ou par détection des protéines virales. L'isolement du virus est problématique car tous les isolats de virus (en particulier les virus de type européen) peuvent ne pas infecter facilement une lignée cellulaire dérivée de la lignée de rein de singe MA-104 (16). Étonnamment, cette lignée de culture cellulaire continue semble être la seule qui permette l'infection par le virus SDRP. Les macrophages alvéolaires de porc (MAP) permettent la réplication de la plupart, sinon de toutes les souches isolées. Cependant, la récolte des MAP n'est pas une chose facile car seulement des porcs en bonne santé et âgés de moins de 8 semaines doivent être retenus comme source de MAP (33). Les différents lots de MAP ne sont pas tous également sensibles au virus SDRP ; il est donc nécessaire de tester chaque lot avant son emploi pour l'isolement. Les MAP peuvent être conservés dans de l'azote liquide jusqu'à leur utilisation comme décrit ci-dessous. L'isolement du virus à l'aide des MAP est une technique qui peut être réalisée dans la plupart des laboratoires de diagnostic. Cette technique est sensible pour l'isolement de toutes les

souches du virus SDRP et sera décrite en détail. La détection des acides nucléiques du virus SDRP peut être réalisée par une transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR), une RT-PCR nichée et une RT-PCR en temps réel (17, 18, 22, 30, 31). Ces épreuves sont fréquemment utilisées pour la recherche de l'acide nucléique dans les tissus ou le sérum. Elles sont particulièrement utiles quand l'isolement viral est problématique, par exemple pour tester la semence (7) ou des tissus partiellement dégradés par autolyse ou par la chaleur durant le transport des échantillons. Une épreuve PCR multiplexe a été élaborée pour différencier les souches nord-américaines et européennes du virus SDRP (11). L'analyse du polymorphisme des longueurs des fragments de restriction (RFLP) réalisée sur des produits amplifiés par PCR a été développée pour différencier les souches vaccinale et sauvage du virus SDRP (34) et récemment, des études moléculaires épidémiologiques de souches du virus SDRP ont été réalisées par des analyses phylogénétiques de séquences spécifiques des gènes structuraux. Toutes ces épreuves basées sur l'acide nucléique sont plus rapides que l'isolement du virus et ne nécessitent pas de locaux dédiés aux cultures cellulaires. Bien que rarement employée pour le diagnostic, l'hybridation *in situ* permet de détecter et de différencier les génotypes des souches nord-américaines et européennes du virus SDRP dans les tissus fixés au formol (20). L'immunohistochimie peut être réalisée pour identifier les protéines virales (12, 19) et quand elle est appliquée sur des tissus fixés au formol, elle permet la visualisation de l'antigène en même temps que les lésions histologiques.

a) Récolte des macrophages alvéolaires des poumons

Les poumons devraient de préférence être obtenus de porcs EAPS ou de porcs provenant d'un troupeau dont on a démontré qu'il était indemne de l'infection par le virus SDRP. De meilleurs résultats sont obtenus lorsque les porcs sont âgés de moins de 8 semaines. Les macrophages devraient être récoltés des poumons le jour même où le porc est abattu. Les poumons doivent être lavés 3 à 4 fois avec un volume total d'environ 200 ml de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) et stérile. Le liquide de lavage récolté est ensuite centrifugé 10 min à 1 000 *g*. Le culot de macrophages ainsi obtenu est suspendu dans du PBS et centrifugé (lavé) deux autres fois. Le culot final est dilué dans 50 ml de PBS, et le nombre de macrophages est compté pour déterminer la concentration cellulaire. On peut utiliser les macrophages frais, ou ils peuvent être conservés dans l'azote liquide suivant les méthodes recommandées, à une concentration finale approximative de 4×10^7 macrophages/1,5 ml. Les différents lots de macrophages ne doivent pas être mélangés.

b) Analyse d'un lot de macrophages alvéolaires

Avant d'utiliser un lot de macrophages, celui-ci doit être validé. Ceci se fait en titrant une souche de référence du virus SDRP ayant un titre connu sur les nouveaux macrophages, et en réalisant la réaction d'immunopéroxydase sur monocouche cellulaire (IPMA) avec des sérums positifs et négatifs connus, sur des plaques ensemencées avec les nouveaux macrophages. Les macrophages sont adéquats seulement si la souche de référence se réplique à son titre habituel (DICT₅₀, Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire). Il est recommandé que les macrophages alvéolaires et le sérum fœtal bovin (SFB) utilisé dans le milieu de culture soient exempts de pestivirus.

c) Isolement viral sur macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires sont ensemencés dans les cupules des plaques de microtitrage à fond plat pour culture cellulaire. Après leur adhésion, les macrophages sont inoculés avec l'échantillon. Ces échantillons peuvent être des sérums, des liquides d'ascite ou des suspensions à 10 % de broyats d'organes tels les amygdales, poumons, nœuds lymphatiques et rate. En général, le virus SDRP induit un effet cytopathogène (ECP) dans les macrophages après 1 à 2 jours de culture, mais il peut y avoir des isolats qui se répliquent en induisant peu d'ECP ou qui induisent un ECP seulement après des passages répétés. Après un délai de 1 à 2 jours ou une fois l'ECP observé, la présence du virus SDRP doit être confirmée à l'aide d'un antisérum spécifique ou d'un anticorps monoclonal (AcM) que l'on utilise dans une coloration immunologique.

i) Ensemencement des macrophages dans les plaques de microtitrage

Décongeler une fiole contenant 6×10^7 macrophages/1,5 ml. Laver les cellules une fois avec 50 ml de PBS et centrifuger la suspension cellulaire 10 min à 300 *g* (à température de la pièce). Suspendre les cellules dans 40 ml de milieu RPMI (*Rose-Peake Memorial Institute*) 1640 contenant 5 % de sérum fœtal bovin (SFB) et 10 % d'un mélange antibiotique (milieu de croissance). Distribuer 100 µl de la suspension cellulaire dans chaque cupule de la plaque de microtitrage (avec une fiole de cellules, 4 plaques peuvent être ensemencées à une concentration de 10^5 cellules dans chaque cupule de la plaque).

ii) *Préparation des dilutions d'échantillons (sérum, liquide d'ascite, broyat d'organe 10 %) dans une plaque non ensemencée*

Distribuer 90 µl de milieu de croissance dans chaque cupule d'une plaque de microtitrage. Ajouter 10 µl d'échantillon dans les cupules des rangées A et E (duplicata de la dilution 1/10). Agiter les plaques et transférer 10 µl des cupules des rangées A et E aux cupules des rangées B et F (dilution 1/100). Agiter les plaques et transférer 10 µl des cupules des rangées B et F aux cupules des rangées C et G (dilution 1/1 000). Agiter les plaques et transférer 10 µl des cupules des rangées C et G aux cupules des rangées D et H (dilution 1/10 000). Agiter les plaques.

iii) *Incubation des échantillons*

Transférer 50 µl des dilutions des échantillons de la plaque non ensemencée aux cupules correspondantes d'une plaque ensemencée avec les macrophages (premier passage). Incuber de 2 à 5 jours et observer quotidiennement pour vérifier la présence d'un ECP. Le second jour, ensemencer des macrophages dans de nouvelles plaques de microtitrage (voir ci-dessus). Transférer 25 µl des surnageants des plaques du premier passage aux cupules correspondantes des plaques fraîchement ensemencées (second passage). Incuber 2 à 5 jours et vérifier l'ECP chaque jour.

iv) *Lecture et interprétation des résultats*

Les cupules dans lesquelles on observe un ECP seulement au premier passage sont considérées comme de fausses positivités dues à la toxicité de l'échantillon. Les cupules dans lesquelles on observe un ECP dans les 2 passages ou dans le second passage seulement sont considérées comme d'éventuels positifs. Toutes les cupules contenant des macrophages qui ne présentent aucun ECP doivent être confirmées quant à leur négativité au virus SDRP par une coloration immunologique avec un antisérum positif au virus SDRP ou un AcM. Les échantillons démontrant un ECP doivent être confirmés positifs au virus SDRP soit par la remise en culture sur les macrophages de ces surnageants d'échantillon, soit par la culture des dilutions originales de l'échantillon, pendant 24 et 48 h, suivie d'une coloration immunologique avec un antisérum positif au virus SDRP ou un AcM.

v) *Coloration immunologique avec un antisérum positif au virus SDRP ou un AcM*

Inoculer les macrophages avec 50 µl de surnageant de l'échantillon tel que décrit dans la section B.2.a, et laisser pousser les cellules infectées 24 et 48 h. Préparer une dilution appropriée du sérum positif au virus SDRP dans un tampon de dilution, et faire la coloration immunologique sur les macrophages tel que décrit dans les sections B.2.a ou B.2.b.

2. Épreuves sérologiques

Différentes épreuves ont été décrites pour la détection des anticorps contre le virus SDRP dans le sérum. Le diagnostic sérologique est, en général, facile à réaliser, résultant en une bonne spécificité et une bonne sensibilité, particulièrement lorsqu'il est utilisé à l'échelle du troupeau. Les sérums de porcs, individuellement, peuvent causer des difficultés dues à des réactions non spécifiques, mais ce problème est résolu en échantillonnant à nouveau le porc 2 à 3 semaines plus tard. La sérologie est habituellement réalisée par une épreuve de blocage telle l'IPMA, d'immunofluorescence ou immuno-enzymatique (ELISA) – épreuve pour laquelle différents protocoles ont été décrits (1, 6, 8, 14, 23, 25, 33, 35). Ces épreuves sont souvent réalisées avec un antigène viral d'un type antigénique, ce qui signifie que les anticorps dirigés contre l'autre type antigénique, hétérologue, peuvent être détectés de façon moins sensible. Un ELISA de blocage a été largement utilisé au Danemark et consiste en un double ELISA utilisant les deux virus, européen et américain, comme antigènes, et permet donc de différencier une réaction sérologique au type européen d'une réaction au type américain (25). Il a été observé que le premier vaccin vivant atténué pour le SDRP, fait à partir d'un virus de type américain, se transmettait à des animaux non vaccinés (3, 27), et le développement subséquent dans les troupeaux de problèmes reproducteurs causés par la souche vaccinale a été rapporté au Danemark (3, 21). On peut s'attendre à une réaction à la souche vaccinale de type américain dans les pays qui utilisent ou ont utilisé ce vaccin ; les pays européens peuvent donc observer des réactions et isoler les deux types antigéniques (3, 21). L'identification de souches de virus SDRP de type européen aux États-Unis et au Canada a aussi été rapportée (10), mais la prévalence de l'infection par de telles souches n'est pas bien documentée.

Les anticorps contre le virus peuvent être détectés par des épreuves sérologiques aussi tôt que 7 à 14 jours après l'infection, et les niveaux d'anticorps atteignent des titres maximaux vers 30 à 50 jours après l'infection. Certains porcs peuvent redevenir séronégatifs entre 3 et 6 mois, mais d'autres demeurent séropositifs beaucoup plus longtemps. Les anticorps neutralisants se développent lentement et n'atteignent pas des titres très élevés. Ils peuvent être détectés à partir de 3 à 4 semaines après l'infection et peuvent persister 1 an ou davantage. Il a été rapporté que la présence de complément dans le mélange réactionnel rendait le test de séroneutralisation plus sensible (15). Il n'existe pas de recherche exhaustive quant à la durée des titres en anticorps après l'infection, et, en outre, les résultats dépendent de l'épreuve utilisée. Les anticorps maternels ont une demi-vie de 12 à 14 jours,

et le titre en anticorps maternels peut, en général, être détecté jusqu'à 4 à 8 semaines après la naissance, dépendant du titre en anticorps de la mère au moment de la naissance et de l'épreuve utilisée. Dans un environnement infecté, les porcs nés de mères séropositives peuvent séroconvertir à partir de l'âge de 3 à 6 semaines.

Ce chapitre décrit le test IPMA en détail puisque ce test peut facilement être réalisé dans les laboratoires qui ont établi les méthodes d'isolement viral sur macrophages, et parce que ce test peut être réalisé avec un virus de l'un ou l'autre type antigénique. Cette épreuve peut aussi être adaptée à la lignée cellulaire MARC-145 infectée par les deux types, européen et américain (25). Une épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) utilisant les cellules MARC-145 peut également être réalisée pour la sérologie de l'infection par le virus SDRP et est décrite dans le présent chapitre. Des kits ELISA commerciaux démontrant une bonne sensibilité et une bonne spécificité sont disponibles et ont été comparés (9).

a) Détection des anticorps avec l'épreuve d'immunopéroxydase sur monocouche cellulaire

Les macrophages alvéolaires sont ensemencés dans les cupules des plaques de microtitrage. Après leur adhésion, les macrophages sont inoculés avec le virus SDRP. L'objectif est d'infecter environ 30 à 50 % des macrophages dans une cupule de façon à pouvoir aisément distinguer les sérums non spécifiques. Après une période d'incubation, les macrophages sont fixés et utilisés comme substrat cellulaire pour la sérologie. Une autre méthode consiste à utiliser des cellules MARC 145 au lieu des macrophages. Sur chaque plaque, 11 sérums peuvent être testés en duplicata. Les sérums testés sont dilués et incubés sur les cellules. Si des anticorps sont présents dans le sérum testé, ils se fixeront à l'antigène présent dans le cytoplasme des macrophages. Lors de l'étape suivante, les anticorps liés seront détectés avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRPO). Enfin, les cellules sont incubées avec une solution substrat chromogène¹. La lecture du résultat de l'épreuve se fait au microscope inversé.

- **Ensemencement des macrophages dans les plaques de microtitrage**

- i) Décongeler une fiole contenant 6×10^7 macrophages/1,5 ml ;
- ii) Laver les cellules une fois avec 50 ml de PBS et centrifuger la suspension cellulaire 10 min à 300 g (à température de la pièce) ;
- iii) Suspendre les cellules dans 40 ml de milieu RPMI 1640 contenant 5 % de SFB, 100 UI (Unités Internationales) de pénicilline et 100 µg de streptomycine (milieu de croissance) ;
- iv) Distribuer 100 µl de suspension cellulaire dans chaque cupule d'une plaque de microtitrage (avec une fiole de cellules, 4 plaques peuvent être ensemencées à une concentration de 10^5 cellules dans chaque cupule d'une plaque) ;
- v) Incuber les plaques de 18 à 24 h à 37 °C dans une étuve avec 5 % de CO₂ en atmosphère humide. Le tampon HEPES (N-2-hydroxyéthylpiperazine, acide N-2-ethanesulfonique) peut également être utilisé dans le milieu.

- **Inoculation des cellules avec le virus SDRP**

- i) Ajouter dans chaque cupule 50 µl de suspension virale contenant 10^5 DICT₅₀/ml, mais laisser 2 cupules non inoculées qui serviront de témoins ;
- ii) Incuber les plaques de 18 à 24 h à 37 °C dans une étuve avec 5 % de CO₂.

- **Fixation des cellules**

- i) Rejeter le milieu de croissance et rincer les plaques une fois avec une solution saline ;
- ii) Tapoter délicatement les plaques sur une serviette pour enlever l'excès de liquide restant et laisser sécher (sans leur couvercle) pendant 45 min à 37 °C ;

¹ *Préparation de la solution chromogène*

Solution stock de chromogène (3-amino-9-ethyl-carbazole [AEC]) : (a) 4 mg AEC; (b) 1 ml N,N-diméthyl-formamide. Dissoudre (a) dans (b) et conserver la solution stock d'AEC à 4 °C à la noirceur.

Préparation de la solution substrat chromogène (préparer juste avant usage)

Préparer le tampon d'acétate de sodium 0,05 M, pH 5, comme suit : dissoudre 4,1 g d'acétate de sodium dans 1 litre d'eau distillée. Ajuster le pH à 5,00 avec l'acide acétique 100 %.

Ajouter 1 ml de solution stock d'AEC à 19 ml du tampon d'acétate de sodium 0,05 M.

Ajouter 10 µl d'H₂O₂ 30 % pour chaque volume de 20 ml de la solution substrat chromogène.

Filtrer la solution à travers un filtre de 5 µm.

- iii) Congeler les plaques (sans le couvercle) pendant 45 min à -20°C . (Les plaques qui ne sont pas immédiatement utilisées pour l'épreuve doivent être scellées et conservées à -20°C) ;
- iv) Incuber les cellules 10 min à température de la pièce avec du paraformaldéhyde 4 % froid (dans du PBS). Une autre façon consiste à fixer les cellules dans l'éthanol absolu glacé pendant 45 min à 5°C ou dans l'acétone 80 % glacé pendant 45 min (5) ;
- v) Rejeter le paraformaldéhyde et rincer les plaques une fois avec une solution saline.

- **Préparation des dilutions de sérums dans une plaque nonensemencée**

- i) Distribuer 180 μl de NaCl 0,5 M avec 4 % de sérum de cheval et 0,5 % de Tween 80, pH 7,2 (tampon de dilution), dans les cupules des rangées A et E des plaques vides ;
- ii) Distribuer 120 μl du tampon de dilution dans toutes les autres cupules ;
- iii) Ajouter 20 μl du sérum à tester ou des sérums témoins dans les cupules des rangées A et E (dilution 1/10), et agiter ;
- iv) Diluer les sérums par des dilutions en facteur de quatre en transférant 40 μl des rangées A et E aux rangées B et F, et ainsi de suite de façon à obtenir des dilutions subséquentes de 1/40, 1/160 et 1/640.

- **Incubation des sérums dans une plaque contenant les macrophages fixés**

- i) Transférer 50 μl de chacune des cupules de la plaque nonensemencée aux cupules correspondantes de la plaque contenant les macrophages fixés. Sceller la (les) plaque(s) et incuber 1 h à 37°C ;
- ii) Rejeter les dilutions des sérums et rincer les plaques 3 fois avec du NaCl 0,15 M et 0,5 % Tween 80.

- **Incubation avec le conjugué**

- i) Diluer le sérum de lapin anti-porc (ou anti-souris, si la coloration de la plaque d'isolement est faite avec un AcM) couplé à la peroxydase à une dilution prédéterminée dans du NaCl 0,15 M et 0,5 % Tween 80. Ajouter 50 μl de la dilution de ce conjugué dans toutes les cupules des plaques. Sceller les plaques et incuber 1 h à 37°C . Rincer les plaques 3 fois.

- **Méthode de coloration**

- i) Distribuer 50 μl de la solution substrat chromogène (AEC) filtrée dans toutes les cupules des plaques (voir la note en bas de page 1) ;
- ii) Incuber la solution AEC pendant au moins 30 min à température de la pièce ;
- iii) Remplacer la solution AEC par 50 μl d'acétate de sodium 0,05 M, pH 5,0 (voir la note en bas de page 1).

- **Lecture et interprétation des résultats**

Si les anticorps sont présents dans le sérum testé, les cytoplasmes d'environ 30 à 50 % des cellules dans les cupules seront colorés en rouge foncé par le chromogène. Un sérum testé est négatif lorsqu'il n'y a aucune coloration du cytoplasme. Un sérum qui réagit de façon non spécifique a tendance à colorer toutes les cellules des cupules (en comparaison avec un sérum témoin positif). Le titre du sérum est exprimé comme la réciproque de la plus forte dilution qui colore 50 % ou plus des cupules. Un sérum avec un titre < 10 est considéré négatif. Un sérum avec un titre de 10 ou 40 est faiblement positif. Une coloration non spécifique est souvent visible à ces dilutions. Un sérum ayant un titre ≥ 160 est positif.

b1) Détection des anticorps avec l'épreuve d'immunofluorescence indirecte

Il n'existe pas actuellement une épreuve d'immunofluorescence (IF) de référence unique et reconnue, mais plusieurs protocoles ont été développés et sont actuellement utilisés dans différents laboratoires en Amérique du Nord. L'épreuve d'IF peut être réalisée dans des plaques de microtitrage ou sur des lames à 8 chambres en utilisant la lignée cellulaire MARC-145 et un isolat du virus SDRP adapté à cette lignée cellulaire. Pour prévenir une réactivité hétérospécifique avec un pestivirus, il est recommandé d'utiliser des cellules et du SFB, utilisés pour compléter le milieu de culture, exempts de pestivirus. Après une période d'incubation, les cellules infectées par le virus SDRP sont fixées et utilisées comme substrat cellulaire pour la sérologie. Les échantillons de sérum sont testés à une seule dilution de criblage de 1/20 et c'est à cette dilution que les échantillons sont déterminés négatifs ou positifs. Chaque sérum porcin à être testé est ajouté dans une cupule ou une chambre contenant les cellules infectées de virus SDRP. S'il y a des anticorps dirigés contre le virus SDRP dans le sérum testé, ils se lieront aux antigènes dans le cytoplasme des cellules infectées. Par la suite, une anti-IgG porcin couplée à la fluorescéine est ajoutée, laquelle se liera aux anticorps porcins qui se sont eux-mêmes liés aux antigènes du virus SDRP présents dans les cellules

infectées. Les résultats sont lus avec un microscope à fluorescence. Les plaques de microtitrage peuvent également être préparées dans le but de titrer des sérums (voir la section b2 ci-dessous).

- **Ensemencement et inoculation des cellules MARC-145 dans les plaques de microtitrage**

- i) Distribuer 50 µl de milieu de culture cellulaire (ex : du milieu MEM, [*Minimal Essential Medium*]) contenant 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate de sodium, 100 UI de pénicilline et 100 µg de streptomycine) sans SFB dans chaque cupule des colonnes 2, 4, 6, 8, 10 et 12 d'une plaque de 96 cupules en utilisant une micropipette multicanaux ;
- ii) Trypsiner les cellules MARC-145 confluentes (cultivées en flacons de culture) à être utilisées pour l'ensemencement des plaques de 96 cupules et suspendre les cellules dans un milieu de culture cellulaire contenant 8 % de SFB à une concentration de 100 000 à 125 000 cellules/ml. Les cellules MARC-145 sont trypsinées des flacons de culture pour l'épreuve d'IF une fois par semaine avec une solution de trypsine-EDTA (*ethylene diamine tetra-acetic acid*) et sont ré-ensemencées dans un flacon de culture à une concentration de 250 000 cellules/ml. Après 4 jours dans les flacons de culture, un milieu de culture frais contenant 2 % de SFB est ajouté pour 3 jours additionnels ;
- iii) À l'aide d'une micropipette multicanaux, distribuer 150 µl de la suspension cellulaire dans chaque cupule de la plaque à 96 cupules ;
- iv) Diluer la préparation de virus SDRP dans du milieu MEM sans SFB à $10^{2.2}$ DICT₅₀/50 µl et en distribuer 50 µl dans chaque cupule des colonnes 1, 3, 5, 7, 9 et 11 ;
- v) Incuber les plaques environ 48 à 72 h à 37 °C dans une étuve à atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ de façon à obtenir une monocouche cellulaire dont 40 à 50 % des cellules sont infectées tel que déterminé par immunofluorescence indirecte. Une autre méthode consiste à ensemercer d'abord les plaques avec une suspension de cellules MARC-145 (ex : à une concentration de 100 000 cellules/ml dans du milieu contenant 5 à 10 % de SFB) et les incuber jusqu'à 72 h pour qu'elles soient confluentes. Ensuite des volumes de 50 µl de suspension virale (ex : 10⁵ DICT₅₀/ml) sont ajoutés dans chaque cupule et les plaques sont incubées pour une période additionnelle de 48 à 72 h avant la fixation. L'emploi de tampons organiques tels que l'HEPES dans le milieu stabiliserait le pH lorsque des étuves à CO₂ ne sont pas disponibles.

- **Ensemencement et inoculation des cellules MARC-145 sur des lames à 8 chambres**

- i) Distribuer 500 µl de suspension de cellules MARC-145 (ex : dans du MEM contenant 10 % de SFB) à une concentration de 100 000 cellules/ml dans chaque chambre des lames à 8 chambres ;
- ii) Incuber les cellules pendant environ 48 à 72 h à 37 °C en atmosphère humide dans une étuve contenant 5 % de CO₂ jusqu'à ce qu'elles soient confluentes ;
- iii) Ajouter dans chaque chambre 50 µl de suspension du virus SDRP contenant 10⁵ DICT₅₀/ml et poursuivre l'incubation environ 18 h à 37 °C en atmosphère humide dans une étuve contenant 5 % de CO₂. À ce moment 15 à 20 cellules infectées par champ peuvent être observées par immunofluorescence indirecte.

- **Fixation des cellules**

- i) Rejeter le milieu, rincer une fois avec du PBS et rejeter le PBS. Pour les lames à 8 chambres, enlever les cloisons des chambres en laissant les joints adhésifs intacts ;
- ii) Ajouter 150 µl d'acétone froide (4 °C) (80 % dans l'eau) dans chaque cupule des plaques à 96 cupules. Incuber les plaques à 4 °C pendant 30 min. Pour les lames avec chambres, l'acétone (80 à 100 %) à température de la pièce est utilisé pour fixer les cellules pendant 10 à 15 min. Certaines marques commerciales d'acétone peuvent dégrader les joints adhésifs des chambres et laisser une pellicule sur la lame. Il est donc recommandé de vérifier l'acétone avant de l'utiliser en routine pour la fixation ;
- iii) Rejeter l'acétone et sécher les plaques ou les lames à température de la pièce ;
- iv) Les plaques peuvent être déposées dans un sac de plastique scellé et conservées à -70 °C jusqu'à l'emploi. Les lames avec chambres peuvent être conservées de la même façon dans des boîtiers à lames.

- **Préparation des dilutions des sérums**

- i) Diluer les échantillons des sérums à 1/20 dans du PBS (0,01 M ; pH 7,2) dans d'autres microplaques à 96 cupules (ex : ajouter 190 µl de PBS à l'aide d'une micropipette multicanaux suivi de 10 µl des sérums à tester) ;

- ii) Inclure comme témoins un antisérum positif au virus SDRP avec un titre connu et un antisérum négatif ;

- **Incubation des sérums avec les cellules MARC-145 fixées**

- i) Les plaques conservées à -70°C sont retirées du congélateur et lorsque celles-ci atteignent la température de la pièce, les cellules sont réhydratées avec 150 μl de PBS pendant quelques minutes. Rejeter le PBS en retournant les plaques sur du papier absorbant. Les cellules sur les lames à 8 chambres ne sont pas réhydratées ;
- ii) Ajouter un volume de 50 μl de chaque sérum dilué dans une cupule contenant des cellules non infectées fixées et dans une cupule contenant des cellules infectées fixées. Ajouter les mêmes volumes de chaque sérum dans les chambres ;
- iii) Ajouter de la même manière des volumes de 50 μl des dilutions des sérums témoins négatif et positif ;
- iv) Incuber les plaques avec leur couvercle à 37°C pendant 30 min en atmosphère humide. Les lames sont incubées de la même façon dans des boîtiers ou supports avec couvercle ;
- v) Retirer les échantillons de sérum et retourner les plaques sur du papier absorbant. Laver 6 fois avec 200 μl de PBS. Le PBS est ajouté dans chaque cupule, puis les plaques sont retournées pour enlever le PBS. Après avoir retiré les échantillons de sérum des lames, celles-ci sont rincées dans du PBS suivi d'un lavage de 10 min.

- **Incubation avec le conjugué**

- i) À l'aide d'une micropipette multicanaux, ajouter dans chaque cupule des volumes de 50 μl de sérum de lapin ou de chèvre anti-IgG de porc (chaînes lourdes et légères) couplé à de l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF), à la dilution appropriée (dans du PBS fraîchement préparé). Les mêmes volumes sont ajoutés dans chaque chambre des lames ;
- ii) Incuber les plaques ou les lames avec leur couvercle à 37°C pendant 30 min en atmosphère humide ;
- iii) Retirer le conjugué des plaques et les vidanger en les retournant sur du papier absorbant. Laver 4 fois avec du PBS tel que décrit précédemment. Rejeter le conjugué des lames, rincer dans le PBS, laver 10 min dans le PBS et rincer dans l'eau distillée. Tapoter les lames sur un papier absorbant pour enlever l'excès d'eau ;
- iv) Les plaques et les lames sont lues au microscope à fluorescence.

- **Lecture et interprétation des résultats**

La présence d'une fluorescence cytoplasmique verte dans les cellules infectées combinée à l'absence d'un tel signal dans les cellules non infectées indique la présence d'anticorps contre le virus SDRP dans le sérum à la dilution testée. Le degré d'intensité de la fluorescence peut varier selon la quantité d'anticorps spécifiques contre le virus SDRP présents dans le sérum testé.

L'absence de fluorescence spécifique dans les cellules infectées et non infectées est interprétée comme une absence d'anticorps contre le virus SDRP dans le sérum à la dilution testée. L'épreuve devrait être reprise s'il n'y a pas de fluorescence avec les sérums témoins positifs sur les cellules infectées ou si la fluorescence est observée avec un sérum témoin négatif sur les cellules infectées. On ne doit pas observer de fluorescence sur les cellules non infectées avec aucun sérum témoin. Tout sérum testé donnant des résultats incertains devrait être testé de nouveau à une dilution 1/20 et si les résultats sont toujours douteux, un nouvel échantillon de sérum du même animal doit être testé.

b2) Titrage des anticorps sériques par immunofluorescence

Les plaques de microtitrage et l'IF peuvent être utilisées pour le titrage des sérums. On peut titrer jusqu'à 16 sérums par plaque de microtitrage à 96 cupules.

- i) Ensemencer les plaques de microtitrage à 96 cupules avec les cellules MARC-145 et incuber à 37°C en atmosphère humide dans une étuve avec 5 % de CO_2 jusqu'à ce qu'elles soient confluentes ;
- ii) Inoculer toutes les cupules avec la préparation virale sauf pour les colonnes 1, 6 et 11, et incuber les plaques à 37°C en atmosphère humide dans une étuve avec 5 % de CO_2 pendant 48 à 72 h ;
- iii) Rejeter le milieu de culture et rincer les cellules une fois avec du PBS (0,01 M, pH 7,2). Fixer les cellules avec de l'acétone froide (solution aqueuse 80 %) pendant 10 min à température ambiante. Rejeter l'acétone, laisser sécher les plaques à l'air et conserver les plaques avec leur

couvercle à -20°C pour un usage à court terme ou à -70°C pour une plus longue durée de conservation ;

- iv) Faire des dilutions sériées de facteur quatre des sérums dans du PBS, incluant un sérum témoin positif au virus SDRP, en commençant par une dilution au 1/16 ou au 1/20. Diluer également un sérum témoin négatif à 1/16 ou 1/20. Distribuer 50 μl de chaque dilution (1/16, 1/64, 1/256, 1/1024 ou 1/20, 1/80, 1/320, 1/1280) dans les cupules contenant l'antigène viral des colonnes 2, 3, 4, 5 ou 7, 8, 9, 10. Pour chaque sérum, distribuer aussi 50 μl de dilution 1/16 ou 1/20 dans les cupules témoins des colonnes 1 et 6. De la même façon distribuer les dilutions des sérums témoins positif et négatif dans les cupules des colonnes 11 et 12 ;
- v) Incuber les plaques à 37°C pendant 30 min en atmosphère humide. Rejeter les sérums et rincer les plaques 3 fois avec du PBS ;
- vi) Ajouter 50 μl du sérum anti-IgG de porc couplé à l'ITCF à la bonne dilution et incuber les plaques à 37°C pendant 30 min en atmosphère humide. Rejeter le conjugué, rincer les plaques plusieurs fois et tapoter les plaques sur un tissu absorbant pour enlever l'excès de liquide.

- **Lecture et interprétation des résultats**

Suite à l'observation au microscope à fluorescence, le titre du sérum est déterminé comme étant la réciproque de la plus grande dilution du sérum à laquelle on observe une fluorescence cytoplasmique typique. Dans le cas des sérums testés par paire, une augmentation du titre de 4 fois dans un intervalle de 2 semaines indique une infection active chez l'animal testé. On ne doit pas observer de fluorescence spécifique avec les sérums testés ou les sérums témoins positif et négatif sur les cellules non infectées. On ne doit pas voir de fluorescence avec le sérum témoin négatif sur les cellules infectées. Une fluorescence spécifique devrait être observée sur les cellules infectées avec le sérum témoin positif aux dilutions appropriées. La dilution limite de l'épreuve d'IF peut varier entre les laboratoires. Les résultats de l'épreuve peuvent aussi varier suivant l'isolat du virus SDRP utilisé, et ce à cause de la diversité antigénique.

c) Détection des anticorps avec une méthode immuno-enzymatique

Plusieurs laboratoires ont développé des tests ELISA (indirect et de blocage) pour faire la sérologie (1, 6, 8, 14, 25). Un ELISA double-blocage pouvant différencier les réactions sérologiques contre le type antigénique européen et le type nord-américain a été décrit (25). Des kits de diagnostic commerciaux ELISA sont disponibles pour déterminer le statut sérologique des porcs envers le virus SDRP. Ces kits utilisent comme antigènes soit des souches de virus SDRP de type européen ou nord-américain séparément ou les utilisent combinées. Leur principal avantage réside dans la possibilité de tester rapidement un grand nombre d'échantillons. Des kits ELISA commerciaux utilisant des protéines recombinantes des deux types de virus SDRP ont aussi été développés et sont disponibles.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Dans de nombreux pays, des vaccins constitués de virus vivant atténué sont disponibles dans le commerce pour le contrôle des formes reproductrices et/ou respiratoires du SDRP. De plus, aux États-Unis et en Europe, un vaccin constitué d'un virus tué est homologué pour aider à réduire les avortements et le nombre de porcelets chétifs associés à la forme reproductrice du SDRP. Tous les vaccins SDRP actuellement homologués aux États-Unis d'Amérique contiennent une souche de type antigénique américain. En Europe, deux vaccins constitués de virus vivants atténués sont homologués et disponibles commercialement ; un est basé sur le type antigénique américain et l'autre sur le type antigénique européen. Il est vraisemblable que la vaccination sera d'autant plus efficace que le virus vaccinal est plus proche antigéniquement du virus sauvage (29). Même si la vaccination des porcs ne prévient pas l'infection par le virus SDRP, elle peut être utile pour les troupeaux ayant des problèmes de SDRP ou pour les troupeaux à risque élevé d'infection par le virus SDRP. Les vaccins vivants atténués ne sont pas faits pour être utilisés dans des troupeaux indemnes, chez les truies ou cochettes gestantes ni chez les verrats reproducteurs. Les vaccins vivants atténués sont faits pour être utilisés chez les truies et cochettes 3 à 6 semaines avant la reproduction et chez les porcelets à partir de l'âge de 3 semaines ou plus, dans le but de diminuer les signes cliniques associés au SDRP. Le virus vaccinal vivant atténué peut persister chez les verrats et être transmis par la semence (7). Le virus vaccinal vivant atténué peut être excrété et transmis à des porcs non vaccinés par contact (27).

Les lignes directrices pour la fabrication de vaccins vétérinaires sont exposées 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 et peuvent être complétées par des exigences nationales et régionales.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

L'isolat de virus SDRP utilisé pour la production d'un vaccin doit être accompagné d'un historique décrivant son origine et les passages. L'isolat doit être sans danger pour le porc vacciné à l'âge recommandé et fournir une protection contre l'infection. L'absence de réversion à la virulence des vaccins vivants atténués doit être démontrée après passage chez les animaux hôtes.

b) Méthode de culture

Le virus SDRP est propagé dans une lignée cellulaire continue de rein de singe vert africain, par exemple MA-104 ou Vero. La propagation virale ne doit pas dépasser 5 passages à partir de la semence virale primaire à moins qu'il ne soit démontré que des passages subséquents fournissent une meilleure protection au porc.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

La semence virale primaire doit être exempte de bactéries, champignons et mycoplasmes. Il doit être démontré par immunofluorescence que la semence primaire est exempte d'autres virus incluant le virus de la gastro-entérite transmissible, l'adénovirus porcin, le circovirus porcin de type 1 et 2, le virus hémagglutinant de l'encéphalite du porc, le parvovirus porcin, tous les pestivirus, le réovirus, et le virus de la rage. Il doit être démontré que la semence primaire est exempte de contamination par d'autres virus, vérifié par observation d'un ECP et hémadsorption sur la lignée cellulaire Vero et une lignée cellulaire embryonnaire de porc.

Il est connu que des isolats de virus SDRP atténués peuvent induire une virémie et se transmettre à des animaux sensibles. Il doit être démontré que la semence virale primaire n'est pas virulente chez les porcelets et les truies gestantes en effectuant 5 passages (jusqu'à 10 passages selon les pays) de cette semence primaire dans les animaux sensibles, et ce par la voie d'infection la plus naturelle.

Dans un essai d'immunogénicité, la semence primaire au dernier passage qui sera utilisé pour la production doit protéger les porcs sensibles contre une souche d'épreuve hétérologue virulente. Dans le cas de la forme respiratoire, des porcelets âgés de 3 semaines sont vaccinés avec le dernier passage de la semence primaire. Les porcelets sont ensuite éprouvés avec un isolat virulent de virus SDRP 2 à 16 semaines plus tard pour déterminer la protection contre les signes cliniques respiratoires de SDRP. Afin de déterminer la protection contre les pertes dues à la forme reproductrice du SDRP, les animaux vaccinés sont éprouvés aux environs du jour 85 de la gestation. Un nombre significatif d'animaux vaccinés doit être protégé contre les signes cliniques reproducteurs, incluant la momification fœtale, les porcelets mort-nés et/ou chétifs, en comparaison avec un groupe témoin. Des études d'essai sur le terrain doivent être menées pour déterminer l'innocuité du vaccin. Des porcs sentinelles non vaccinés devraient être inclus à chaque étape afin de vérifier s'il y a excrétion du virus atténué.

2. Méthode de fabrication

La lignée cellulaire de rein de singe vert africain estensemencée dans des flacons appropriés. Du milieu MEM contenant du SFB est utilisé pour la production ; le SFB doit être exempt de pestivirus ou d'anticorps contre un pestivirus de même que sans risque d'encéphalopathie spongiforme bovine. L'incubation se fait à 37 °C.

Les cultures cellulaires sont inoculées directement avec la préparation virale de travail, qui est généralement entre le premier et le quatrième passage de la semence primaire. Les cultures cellulaires infectées sont incubées pendant 1 à 8 jours avant récolte du milieu de culture. Pendant l'incubation, les cultures sont observées quotidiennement pour l'ECP et la contamination bactérienne.

Les virus vaccinaux tués sont inactivés chimiquement avec du formol ou de l'éthylène-imine binaire et mélangés avec un adjuvant approprié. Les vaccins vivants atténués sont généralement mélangés avec un produit stabilisant avant l'embouteillage et la lyophilisation. Si le formol est utilisé pour inactiver le virus, on doit vérifier que le produit final ne contient pas plus de 0,74 g/litre de formol résiduel.

3. Contrôles en cours de fabrication

Les lots de virus SDRP produits doivent être titrés en culture cellulaire pour la normalisation du produit. Les lots de virus qui ont un titre faible peuvent être concentrés ou mélangés avec des lots ayant des titres plus élevés afin d'obtenir le bon titre viral.

4. Contrôles des lots

Les échantillons des fioles conditionnées sont testés quant à leur pureté, leur innocuité et leur puissance. Les fioles de virus vivant atténué sont également testées pour leur contenu maximal en humidité permis.

a) Pureté

Les échantillons sont vérifiés pour la contamination bactérienne, fongique et par un pestivirus. Pour vérifier la présence de bactéries, 10 flacons, chacun contenant 120 ml de milieu de caséine de soya, sont inoculés avec 0,2 ml des échantillons de 10 fioles conditionnées. Les 10 flacons sont incubés entre 30 et 35 °C pendant 14 jours et observés pour vérifier la croissance bactérienne. Pour tester la présence de champignons, 10 flacons, chacun contenant 40 ml de milieu de caséine de soya, sont inoculés avec 0,2 ml des échantillons de 10 fioles conditionnées. Les flacons sont incubés entre 20 et 25 °C pendant 14 jours et observés pour la croissance fongique.

b) Innocuité

Les tests d'innocuité peuvent être faits chez les cobayes, souris ou porcs.

c) Activité

Les échantillons des fioles conditionnées de vaccin de virus vivant atténué sont titrés (\log_{10}) dans des plaques de microtitrage.

- **Protocole**

- Préparer des dilutions en facteur de 10 de 10^{-1} à 10^{-5} en mélangeant 0,2 ml du vaccin réhydraté à tester et 1,8 ml de MEM. Un témoin interne positif de virus SDRP devrait être titré dans l'écart de dilution approprié ;
- Inoculer 0,1 ml/cupule de chaque dilution dans 5 cupules d'une plaque à 96 cupules contenant des couches monocellulaires de rein de singe africain ;
- Incuber la plaque à 37 °C dans une étuve à CO_2 pendant 5 à 7 jours ;
- Observer les plaques au microscope pour l'ECP. Le témoin positif interne de virus SDRP devrait avoir un titre en dedans de $0,3 \log_{10} \text{ DICT}_{50}$ de son titre moyen prédéterminé ;
- Déterminer la dose DICT_{50} par la méthode de Spearman–Kärber. Le titre résultant doit être au moins 1,2 log plus élevé que le titre utilisé dans l'essai d'immunogénicité. Le chiffre de 1,2 log inclut 0,5 log pour la stabilité durant la durée de conservation du produit et 0,7 log pour la variabilité dans le test d'activité.

Pour déterminer la puissance des vaccins tués, l'animal hôte ou un animal de laboratoire peut être utilisé dans les épreuves de vaccination/sérologie ou les tests de vaccination/épreuves. Des titrages en séries parallèles, utilisant les techniques de quantification d'antigène ELISA pour comparer un échantillon de référence avec le produit final, sont acceptables pour déterminer la puissance relative du produit. Il doit être démontré au préalable que l'échantillon de référence induit une protection chez l'animal hôte.

d) Durée de l'immunité

Des études concernant la durée de l'immunité sont menées avant que le vaccin ne reçoive l'homologation finale. En ce qui a trait à la forme respiratoire du SDRP, la durée devrait s'étendre jusqu'à l'âge de l'abattage du porc. La durée de l'immunité pour la forme reproductrice devrait s'étendre jusqu'au sevrage des porcelets.

e) Stabilité

On doit donner initialement à tous les vaccins une durée de conservation de 24 mois avant l'expiration. Des études sur la durée réelle de la stabilité sont ensuite réalisées pour confirmer la pertinence de la date d'expiration.

f) Agents de conservation

Des antibiotiques sont ajoutés lors de la fabrication, généralement du sulfate de gentamicine ou la néomycine ne dépassant pas 30 µg/ml.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Avec des vaccins correctement inactivés, il n'existe aucun risque de réversion vers la virulence. Cependant, il n'en va de même quand on emploie des vaccins à virus vivant atténué. Pour limiter ce risque potentiel, la vaccination avec un vaccin à virus vivant atténué n'est recommandée que dans les élevages positifs vis-à-vis du virus SDRP pour favoriser la diminution des signes cliniques associés avec les formes respiratoires et/ou reproductrices du SDRP. Il n'est pas recommandé d'utiliser les vaccins à virus vivant sur des truies en gestation, les cochettes ou les verrats reproducteurs. Il a été démontré que le premier vaccin vivant atténué pour le SDRP, préparé à partir d'une souche américaine du virus, s'était transmis à des animaux non vaccinés (3, 27) et avait par la suite induit des troubles de la reproduction dans les troupeaux atteints (3, 21). Il existe de plus en plus de preuves que les vaccins vivants atténués peuvent aussi se transmettre aux animaux non vaccinés ; ils traverseraient la barrière placentaire et entraîneraient la naissance de porcelets congénitalement infectés (24).

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir section C.4.b.

b) Activité

Voir section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALBINA E., LEFORBAN Y., BARON T., PLANA DURAN J. & VANNIER P. (1992). An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann. Rech. Vet.*, **23**, 167–176.
2. BENFIELD D.A., COLLINS J.E., DEE S.A., HALLBUR P.G., JOO H.S., LAGER K.M., MENGELING W.L., MURTAUGH M.P., ROSSOW K.D., STEVENSON G.W. & ZIMMERMAN J.J. (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome. In: *Diseases of Swine*, Eight Edition, Straw B.E., D'Allaire S., Mengeling W.L. & Taylor D.J., eds. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA, 201–232.
3. BOTNER A., STRANDBYGAARD B., SORENSEN K.J., HAVE P., MADSEN K.G., MADSEN E.S. & ALEXANDERSEN S. (1997). Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet. Rec.*, **141**, 497–499.
4. BRINTON M.A., GODENY E.K., HORZINEK M.C., MEULENBERG J.J.M., MURTAUGH M.P., PLAGEMANN P.G.W. & SNIJDER E.J. (2000). Arteriviridae. In: *Virus Taxonomy*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. & Wickner R.B., eds. Academic Press, San Diego, USA, 851–857.
5. CHANG C.C., YOON K.J., ZIMMERMAN J.J., HARMON K.M., DIXON P.M., DVORAK C.M. & MURTAUGH M.P. (2002). Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. *J. Virol.*, **76**, 4750–4763.
6. CHO H.J., McNAB B., DUBUC C., JORDAN L., AFSHAR A., MAGAR R., PRINS S. & EERNISSE K. (1997). Comparative study of serological methods for the detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.*, **61**, 161–166.
7. CHRISTOPHER-HENNINGS J., NELSON E.A., NELSON J.K. & BENFIELD D.A. (1997). Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 40–45.
8. DENAC H., MOSER C., TRATSCHIN J.D. & HOFMANN M.A. (1997). An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen. *J. Virol. Methods*, **65**, 169–181.
9. DREW T.W. (1995). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome in boar semen by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 1730–1734.

10. FANG Y., KIM D.Y., ROPP S., STEEN P., CHRISTOPHER-HENNINGS J., NELSON E.A. & ROWLAND R.R.R. (2004). Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States. *Virus Res.*, **100** (2), 229–235.
11. GILBERT S.A., LAROCHELLE R., MAGAR R., CHO H. J. & DEREGT D. (1997). Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses by a multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 264–267.
12. HALBUR P.G., ANDREWS J.J., HUFFMAN E.L., PAUL P.S., MENG X.-J. & NIYO Y. (1994). Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 254–257.
13. HALBUR P.G., PAUL P.S., FREY M.L., LANDGRAF J., EERNISSE K., MENG X.-J., LUM M.A., ANDREWS J.J. & RATHJE J.A. (1995). Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.*, **32**, 648–660.
14. HOUBEN S., CALLEBAUT P. & PENSART M.B. (1995). Comparative study of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *J. Virol. Methods*, **51**, 125–128.
15. DEA S., GAGNON C.A., MARDASSI H. & MILANE G. (1996). Slow-reacting and European strains of porcine reproductive and respiratory (PRRS) virus. *J. Vet. Med. Sci.*, **58**, 749–753.
16. KIM H.S., KWANG J., YOON I.J., JOO H.S. & FREY M.L. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.*, **133**, 477–483.
17. KLEIBOEKER S.B., SCHOMMER S.K., LEE S.M., WATKINS S., CHITTICK W., POLSON D. (2005). Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 165–170.
18. DREW T.W. (1995). Comparative serology of porcine reproductive and respiratory syndrome in pigs. *J. Vet. J.*, **152**, 153–174.
19. LAROCHELLE R. & MAGAR R. (1995). Production, characterization and reactivity of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.*, **76**, 1361–1369.
20. LAROCHELLE R., MAGAR R. (1997). Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses by in situ hybridization. *J. Virol. Methods*, **68**, 161–168.
21. MADSEN K.G., HANSEN C.M., MADSEN E.S., STRANDBYGAARD B., BOTNER A. & SORENSEN K.J. (1998). Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 254–257.
22. MARDASSI H., WILSON L., MOUNIR S. & DEA S. (1994). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.*, **32**, 648–660.
23. NOELIJK G., WENSVOORT G., KROESE B., VAN LEENGOED L., COLIJN E. & VERHEIJDEN J. (1996). Comparison of a commercial ELISA and an immunoperoxidase monolayer assay to detect antibodies directed against porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Vet. Microbiol.*, **49**, 285–295.
24. SCORTTI M., PRIETO C., MARTINEZ-LOBO F.J., SIMARRO I. & CASTRO J.M. (2006). Effects of two commercial European modified-live vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in pregnant gilts. *Vet. J.*, **172**, 506–514.
25. JUSA E.R., INABA Y., KOUNO M., HIROSE O., SHIBATA I., KUBOTA M. & YASUHARA H. (1996). Slow-reacting and complement-requiring neutralizing antibody in swine infected with porcine reproductive and respiratory (PRRS) virus. *J. Vet. Med. Sci.*, **58**, 749–753.
26. STADEJEK T., OLEKSIWICZ M.B., POTAPCHUK D. & PODGORSKA K. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J. Gen. Virol.*, **87**, 1835–1841.
27. TORRISON J., KNOLL M. & WISEMAN B. (1996). Evidence of pig-to-pig transmission of a modified-live PRRS virus vaccine. *Proc. Am. Assoc. Swine Practitioners*, 89–91.

28. VAN VUGT J.J.F.A., STORGAARD T., OLEKSIEWICZ M.B. & BOTNER A. (2001). High frequency RNA recombination in porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs preferentially between parental sequences with high similarity. *J. Gen. Virol.*, **82**, 2615–2620.
29. LAROCHELLE R. & MAGAR R. (1997). Differentiation of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus genotypes by in situ hybridization. *J. Virol. Methods*, **68**, 161–168.
30. LAROCHELLE R. & MAGAR R. (1997). Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.*, **47**, 273–278.
31. WASILK A., CALLAHAN J.D., CHRISTOPHER-HENNINGS J., GAY T.A., FANG Y., DAMMEN M., REOS M.E., TORREMORELL M., POLSON D., MELLENCAMP M., NELSON E. & NELSON W.M. (2004). Detection of U.S., Lelystad, and European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and relative quantitation in boar semen and serum samples by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 4453–4461.
32. MAGAR R., LAROCHELLE R., NELSON E.A. & CHARREYRE C. (1997). Differential reactivity of a monoclonal antibody directed to the membrane protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.*, **61**, 69–71.
33. WENSVOORT G., TERPSTRA C., POL J.M.A., TER LAAK E.A., BLOEMRAAD M., DE KLUYVER E.P., WENSVOORT G. & MOORMANN R.J.M. (1993). Lelystad virus, the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.*, **13**, 121–130.
34. WESLEY R.D., MENGELING W.L., LAGER K.M., CLOUSER D.F., LANDGRAF J.G. & FREY M.L. (1998). Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 5. *J. Vet. Diagn. Invest.* **10**, 140–144.
35. YOON I.J., JOO H.S., CHRISTIANSON W.T., KIM H.S., COLLINS J.E., MORRISON R.B. & DIAL G.D. (1992). An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**, 144–147.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour le syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (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).

CHAPITRE 2.8.8.

GRIPPE PORCINE

RÉSUMÉ

La grippe porcine est une infection virale hautement contagieuse des porcs. Les infections à virus influenza porcine (SIV, Swine influenza virus) sont la cause d'une maladie respiratoire caractérisée par de la toux, des éternuements, du jetage, des températures rectales élevées, de la léthargie, une respiration difficile et une baisse de l'appétit. Dans certains cas, les infections à SIV sont associées à des troubles de la reproduction tel l'avortement. Les signes cliniques et l'excrétion nasale du virus peuvent survenir dans les 24 h suivant l'infection. Les taux de morbidité peuvent atteindre 100 % dans les cas d'infections par le SIV, tandis que les taux de mortalité sont généralement faibles. Les infections bactériennes secondaires peuvent aggraver les signes cliniques résultant de l'infection à SIV. La transmission se fait par contact avec des sécrétions contenant des particules virales, telles que les aérosols, générés par les toux et les éternuements, et les jetages nasaux.

Identification de l'agent pathogène : le meilleur moyen pour identifier le virus est de collecter des prélèvements dans les 24 à 48 h qui suivent l'apparition des signes cliniques. L'animal de choix est un animal non traité, encore malade, avec une température rectale élevée. Le virus peut être facilement détecté dans le tissu pulmonaire et les écouillons nasaux. L'isolement viral peut être effectué sur œufs de poule embryonnés et sur lignées cellulaires continues. Les virus isolés peuvent être sous-typés par les tests d'inhibition de l'héماغglutination (IHA) et d'inhibition de la neuraminidase, ou par transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase. Une analyse par immunohistochimie peut être menée sur prélèvements de tissu fixés au formol et une épreuve d'immunofluorescence peut-être réalisée sur tissu frais. Des épreuves immuno-enzymatiques (ELISA) sont disponibles dans le commerce pour la détection des virus influenza de type A.

Épreuves sérologiques : la principale épreuve sérologique pour la détection des anticorps anti-SIV est l'IHA menée sur des paires de sérums. L'IHA est spécifique du sous-type. Les sérums sont généralement collectés à 10-21 jours d'intervalle. Une augmentation du titre de 4 fois ou plus entre le premier et le deuxième prélèvement évoque une infection SIV récente. Les autres épreuves sérologiques qui ont été décrites sont l'épreuve d'immunodiffusion en gélose, l'épreuve d'immunofluorescence indirecte, la neutralisation virale et l'ELISA.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : des vaccins inactivés et adjuvés sont disponibles dans le commerce. Les vaccins peuvent relever d'un seul sous-type de SIV ou contenir plusieurs sous-types. Les vaccins doivent refléter le profil antigénique des souches contemporaines en circulation sur le terrain, en contenant sous-types et souches qui sont changés en tant que de besoin, afin d'assurer la protection. Le vaccin adapté doit avoir été démontré être pur, sans danger, actif et efficace.

A. INTRODUCTION

La grippe porcine est une infection hautement contagieuse des porcs pouvant avoir un impact économique significatif sur un troupeau atteint (26, 32). Le virus influenza porcine (SIV) est un orthomyxovirus de type A, à génome à ARN segmenté. Les virus influenza porcins de type A sont eux-mêmes subdivisés sur la base de leurs protéines : héماغglutinine et neuraminidase. Les sous-types de SIV qui sont les plus fréquemment identifiés chez les porcs sont le virus classique aviaire H1N1, les virus recombinants (r) H3N2 et rH1N2 (5, 9, 10, 21, 25, 29). Les autres sous-types qui ont été identifiés chez les porcs incluent rH1N7, rH3N1, avH4N6 (aviaire), avH3N3 et avH9N2 (2, 13, 16, 26, 28). Les virus H1N1, H1N2 et H3N2 trouvés en Europe sont antigéniquement et génétiquement différents de ceux trouvés aux États-Unis d'Amérique (1, 3, 4, 7, 13-16, 23, 24, 31, 37-39). Les

porcs ont, dans leur tractus respiratoire, des récepteurs qui vont lier les virus influenza porcins, humains et aviaires. En conséquence, les porcs ont été appelés « récepteurs de mélange » pour l'apparition de nouveaux virus influenza lorsque des virus influenza porcins, humains et aviaires subissent des recombinaisons génétiques chez les porcs (12). Les infections à SIV sont décrites comme responsables d'une maladie respiratoire caractérisée par de la toux, des éternuements, du jetage, des températures rectales élevées, de la léthargie, une respiration difficile et une diminution de l'appétit. Les autres agents pouvant provoquer une maladie respiratoire chez les porcs incluent le virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (SDRP), le virus de la Maladie d'Aujeszky (virus de la pseudo-rage), le coronavirus respiratoire porcin, *Actinobacillus pleuropneumoniae* et d'autres bactéries, ainsi que *Mycoplasma hyopneumoniae*. Cependant, la plupart d'entre eux sont responsables d'autres signes cliniques ne ressemblant pas à ceux de la grippe porcine (20). *Actinobacillus pleuropneumoniae*, dans la forme aiguë de l'infection, entraîne les signes cliniques les plus similaires à la grippe porcine, tels que dyspnée, tachypnée, respiration abdominale, toux, fièvre, dépression et anorexie. Les signes cliniques et l'excrétion nasale du SIV peuvent avoir lieu au cours des 24 h suivant l'infection mais l'excrétion cesse, en général, 7 à 10 jours après l'infection. Deux formes de la maladie surviennent chez le porc, épidémique ou endémique. Dans la forme épidémique, le virus passe rapidement à travers toutes les phases d'une unité d'élevage avec un rétablissement rapide évitant ainsi les facteurs de complication, tel que les infections bactériennes secondaires. Dans la forme endémique, les signes cliniques peuvent être moins évidents et tous les porcs peuvent ne pas afficher les signes cliniques traditionnels de l'infection. Les taux de morbidité peuvent atteindre 100 % lors des infections à SIV, tandis que les taux de mortalité sont généralement faibles. Le principal impact économique est relatif au retard de croissance qui résulte en une augmentation du nombre de jours requis pour atteindre le poids de vente. La transmission se fait par contact avec des sécrétions contenant du virus, telles que le jetage nasal et les aérosols générés par la toux et la sternutation. Des infections humaines à SIV peuvent avoir lieu et des décès en nombre limité ont été rapportés (9, 10, 22, 25). Des précautions doivent être prises pour prévenir l'infection humaine, comme décrit au Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries ». Inversement, les virus grippaux humains peuvent être transmis du personnel qui s'occupe des animaux vers les porcs. De même, les virus grippaux peuvent être transmis des volailles aux porcs et des porcs aux volailles.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Parce que le SIV est un agent potentiellement pathogène pour l'homme, tous les travaux impliquant la manipulation de tissus infectés, d'écouillons, d'œufs embryonnés et de cultures cellulaires doivent être menés en laboratoire de biosécurité de classe II.

a) Culture

- **Traitement de l'échantillon**

Le tissu pulmonaire peut être traité de différentes manières en vue de l'isolement viral, avec par exemple mortier et piston, broyeur, homogénéisateur, ou émincé à l'aide d'une lame de scalpel ou de ciseaux. Le traitement du tissu se fait dans du milieu de culture cellulaire supplémenté en antibiotiques (i.e. 10× concentration de travail), à une concentration finale de 10 à 20 % poids/volume. Les écouillons nasaux doivent être collectés dans du milieu de culture cellulaire ou dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), avec des antibiotiques et de la séro-albumine bovine (5 mg/ml). Il ne faut pas ajouter de sérum fœtal de veau. Idéalement, les échantillons devraient être envoyés, non congelés mais sur glace fondante, au laboratoire de diagnostic dans la journée. À réception au laboratoire, les écouillons nasaux sont agités vigoureusement à la main ou sur un agitateur vortex. Les suspensions issues des écouillons et des poumons sont centrifugées à 1 500-1 900 *g* pendant 15 à 30 min à 4 °C. Le surnageant est collecté et conservé à 4 °C jusqu'à l'inoculation. Si le surnageant ne peut être inoculé dans les 24 h suivant la collecte, il doit être stocké à -70 °C. Le surnageant d'un broyat de poumon est inoculé sans dilution supplémentaire. Le surnageant issu d'un écouillon nasal peut également être inoculé sans dilution, ou dilué au 1/3 dans du milieu de culture cellulaire. Les antibiotiques sont ajoutés au milieu de culture cellulaire utilisé pour le traitement, et/ou le surnageant peut être filtré, afin de réduire les risques de contamination bactérienne, mais ceci peut diminuer le titre viral. Une autre méthode consiste à traiter la suspension virale avec des antibiotiques tels que la gentamycine (100 µg/ml) ou de la pénicilline (10 000 unités/ml), streptomycine (10 000 unités/ml) et de la fongizone à 2 % (250 mg/ml) pendant 30 à 60 min à 4 °C avant d'inoculer les œufs embryonnés ou les cultures de cellules.

- **Isolement viral en culture cellulaire**

- i) L'isolement viral peut être conduit sur des lignées cellulaires ou des cellules de première explantation permissives à l'infection SIV. La lignée de rein de chien de Madin-Darby (MDCK pour *Madin-Darby*

Canine Kidney) est la lignée cellulaire de choix, mais des cellules de première explantation de rein de porc, de testicules de porc, de poumon de porc, ou de trachée de porc peuvent être utilisées ;

- ii) Laver 3 fois les monocouches de cellules confluentes (48 à 72 h après l'ensemencement) avec du milieu de culture cellulaire contenant une concentration finale de 1 µg/ml de trypsine traitée au TPCK¹ ; cependant, la concentration dépendra du type de trypsine et des cellules employées (0,3 à 10 µg/ml peuvent être utilisés). Le milieu de culture cellulaire peut être supplémenté en antibiotiques, mais n'est pas supplémenté en sérum fœtal de bovin ;
- iii) Inoculer les cultures cellulaires avec une quantité appropriée de suspension de tissu ou de surnageant d'écouvillon. Remarque : le volume de l'inoculum variera en fonction de la taille du récipient de culture cellulaire. En général, 100 à 200 µl sont inoculés dans chacun des puits d'une plaque de culture de 24 puits, 1 ml dans un tube Leighton, et 1 à 2 ml dans un flacon de 25 cm² ;
- iv) Incuber les cultures cellulaires inoculées pendant 1 à 2 h à 37 °C en agitant de temps en temps. Quand les récipients de culture cellulaire sont ouverts à l'environnement, comme les plaques de culture, l'incubation doit être faite dans un incubateur humidifié, en présence de 5 % de CO₂ ;
- v) Éliminer l'inoculum et laver la monocouche de cellules 3 fois avec le milieu de culture cellulaire contenant la trypsine ;
- vi) Ajouter un volume approprié de milieu de culture cellulaire de survie dans tous les récipients et incuber à 37 °C pendant 5 à 7 jours, tout en observant régulièrement afin de noter l'apparition d'un effet cytopathogène (ECP). Si aucun ECP n'est observé à la fin de la période d'incubation, le récipient de culture cellulaire peut être congelé à -70 °C, décongelé, et un deuxième passage en aveugle peut être réalisé comme décrit ci-dessus [étape iii)]. Si un ECP est observé, un aliquot du milieu de culture cellulaire peut être testé quant à la présence d'un virus hémagglutinant ou par transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) des gènes conservés chez les virus influenza tels que les gènes de la matrice ou de la nucléoprotéine, et peut être collecté et utilisé comme inoculum pour confirmation par la technique d'immunofluorescence (voir Section B.1.e ci-dessous). Des monocouches de cellules MDCK (ou autre type de cellule approprié), sur lamelles (tube Leighton, plaques de culture 24 puits) ou dans des chambres de culture sur lame, peuvent être inoculées à ce propos. La méthode d'isolement est la même que décrite plus haut [étape iii)]. Dans certains cas, il peut être nécessaire de faire des dilutions de 10 en 10 du virus multiplié en culture cellulaire afin d'avoir un ECP approprié sur la lame. Les sous-types de SIV peuvent être déterminés par les tests d'inhibition de l'hémagglutination (IH) et de la neuraminidase (IN) ou par RT-PCR avec des amorces validées pour l'amplification spécifique des gènes de l'hémagglutinine et de la neuraminidase.

- **Inoculation d'œufs (30)**

- i) Utiliser des œufs de poule embryonnés de 10 à 11 jours d'âge ;
- ii) Inoculer 0,1 à 0,3 ml d'inoculum dans la cavité allantoïdienne et le sac amniotique. Beaucoup de laboratoires inoculent uniquement par voie allantoïdienne avec une sensibilité similaire. Généralement, 3 ou 4 œufs sont inoculés par échantillon ;
- iii) Incuber les œufs entre 35 et 37 °C pendant 3 à 4 jours et mirer quotidiennement. Les œufs dont les embryons meurent dans les 24 h suivant l'inoculation sont éliminés ;
- iv) Réfrigérer les œufs dont les embryons sont morts plus de 24 h après l'inoculation. À la fin de la période d'incubation, prélever les liquides allantoïdiens et amniotique des œufs portant des embryons morts et des œufs avec des embryons encore viables. Tous les produits des œufs doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être traités de manière à prévenir l'exposition du manipulateur au SIV ;
- v) Centrifuger les liquides à 1 500-1 900 *g* pendant 10 à 20 min à 4 °C. Transférer le surnageant dans un autre tube pour analyse ;
- vi) Les fluides sont analysés vis-à-vis de la présence de SIV à l'aide d'un test d'hémagglutination (HA) (voir ci-dessous) ;
- vii) Réinoculer les fluides ne présentant pas d'activité hémagglutinante (négatifs pour le SIV) sur œufs ou sur cultures cellulaires, comme décrit ci-dessus. L'isolement peut être amélioré en diluant les liquides de 10 en 10 dans du milieu de culture cellulaire. Des antibiotiques peuvent être ajoutés au milieu de culture cellulaire.

1 TPCK: tosyl-phényl-alanyl-chlorométhane

- **Test d'hémagglutination**

- Préparer une suspension d'érythrocytes à 0,5 % à partir de sang de dindon ou de poulet. Certaines souches agglutinent, à des degrés plus ou moins grands, plutôt les globules rouges de dindon que ceux de poulet. Il convient, par conséquent, de choisir les espèces donnant les globules rouges en fonction des souches qui circulent dans la zone considérée. Les érythrocytes lavés et les suspensions d'érythrocytes à 0,5 % peuvent être conservés à 4 °C pendant 1 semaine. Éliminer en cas d'hémolyse ;
- Déposer 50 µl de PBS dans une rangée de 8 ou 12 puits d'une plaque de microtitrage à 96 puits à fonds en V ou en U, ceci pour chaque virus à identifier. Les puits à fond en U sont préférés aux puits à fond en V. Une rangée supplémentaire de puits doit être incluse pour un témoin positif ;
- Ajouter 50 µl d'isolat non dilué dans le premier puits de chaque rangée correspondante ;
- Diluer l'isolat en série à l'aide d'une micropipette réglée pour délivrer 50 µl. Les dilutions résultantes vont ainsi aller de 1/2 (puits n°1) à 1/2048 (puits n°11). Le puits n°12 contient seulement du PBS et sert de témoin cellulaire ;
- Ajouter 50 µl de suspension d'érythrocytes à 0,5 % dans chaque puits et agiter la plaque pour bien mélanger. Remarque : bien maintenir les érythrocytes en suspension pendant l'étape de distribution ;
- Couvrir la plaque avec du film adhésif et incuber à température ambiante jusqu'à ce qu'un culot distinct se soit formé dans le puits témoin (30 à 60 min) ;
- Dans les puits où l'hémagglutination est complète (HA positive, SIV présent), les érythrocytes se dispersent dans tout le puits en formant un tapis continu d'apparence mate au fond de la cupule. Les puits où les érythrocytes sédimentent au fond de la cupule en formant un culot central sont négatifs au regard de l'activité hémagglutinante (négatif pour le SIV). Une activité HA incomplète est mise en évidence par la formation de culots partiels, caractérisés par des bords flous ou ressemblant à des beignets. Quand l'interprétation entre inhibition négative et incomplète est difficile, incliner la plaque de microtitration d'environ 45 degrés pendant 20 à 30 s et observer le coulage, lequel produit, dans les puits où l'hémagglutination est négative, une traînée de cellules, fine, légèrement renflée à son extrémité et translucide. Les puits où l'inhibition est partielle ne produiront pas de « larme ».

b) Typage des isolats de SIV

- **Test d'inhibition de l'hémagglutination**

- Diluer les antigènes HA de référence (H1, H3, etc.) à une concentration de 8 unités HA (HAU) pour 50 µl (4 HAU/25 µl) dans du PBS 0,01 M, pH 7 ;
- Normaliser les virus influenza A inconnus afin qu'ils contiennent 8 HAU dans 50 µl ;
- Effectuer un nouveau titrage (test d'HA) pour tous les isolats inconnus et les antigènes de sous-type H afin de vérifier que le nombre d'unités HAU est correct. Le titrage de contrôle est réalisé comme décrit dans le protocole du test d'HA, à l'exception près que 6 puits de dilutions sont utilisés au lieu de 11 ;
- Traiter chaque sérum de référence (spécifique d'un sous-type HA unique) au RDE (*Receptor-destroying enzyme*) : ajouter 50 µl de sérum à 200 µl de RDE (dilué au 1/10 dans une solution saline de calcium, ce qui équivaut à 100 unités par ml). Incuber une nuit (12 à 18 h) dans un bain-marie à 37 °C. Ajouter 150 µl d'une solution de citrate de sodium à 2,5 % et inactiver le sérum à la chaleur à 56 °C pendant 30 min. Mélanger 200 µl d'échantillon traité et 25 µl de PBS afin de réaliser une dilution au 1/10 du sérum. Remarque : le traitement RDE est recommandé car il réduira les réactions non spécifiques d'hémagglutination et améliorera l'identification des isolats H1N2 et H3N2 ;
- Éliminer les agglutinines sériques naturelles en traitant 1 ml de sérum dilué par 0,1 ml d'érythrocytes concentrés et lavés. Incuber pendant 30 min à température ambiante en mélangeant de temps en temps afin de maintenir les érythrocytes en suspension. Centrifuger les sérums traités à 800 g pendant 10 min, puis les réserver ;
- Distribuer 25 µl d'antigène normalisé (isolat inconnu ou antigène témoin positif) dans 3 puits d'une plaque de microtitrage à 96 puits à fond en V ou en U. Ajouter 50 µl de PBS dans plusieurs puits qui serviront de témoin cellulaire érythrocyte. Remarque : 25 µl de PBS peuvent être utilisés à la place des 25 µl d'antigène normalisé ;
- Ajouter 25 µl d'antisérum normalisé approprié dans le premier puits du sous-type H devant être testé. Diluer l'antisérum en série dans les puits antigène, dans un volume de 25 µl, à l'aide d'une pipette réglée pour délivrer 25 µl. Répéter cette procédure pour chacun des sous-types H devant être testé. Remarque : si 25 µl de PBS sont utilisés à la place des 25 µl d'antigène normalisé à l'étape vi), ajouter 25 µl d'antigène normalisé dans chaque puits contenant l'antisérum normalisé ;
- Couvrir la (les) plaque(s) et incuber à température ambiante pendant 10 à 30 min ;

- ix) Ajouter 50 µl d'une suspension d'érythrocytes à 0,5 % dans chaque puits et agiter la (les) plaque(s) pour bien mélanger. Bien maintenir les érythrocytes en suspension pendant la phase de répartition ;
- x) Couvrir les plaques avec un film adhésif et incuber à température ambiante jusqu'à ce qu'un culot distinct se soit formé dans les puits témoins positifs (généralement 30 à 60 min). Pour évaluer l'hémagglutination, observer les plaques après environ 20 min d'incubation étant donné que certains isolats pourraient commencer à éluer (se détacher des érythrocytes) au bout de 30 min ;
- xi) Lire les résultats du test comme décrit plus haut pour le test d'HA. Un échantillon est considéré positif pour un sous-type H donné si l'hémagglutination est inhibée. Le test est considéré valide si l'antigène de référence positif et son antisérum homologue fournissent le titre IHA attendu et que le titrage de contrôle de chaque antigène (inconnu et témoin positif) est de 8 HAU. Si ces conditions ne sont pas respectées, le test doit être répété ;
- xii) Si les érythrocytes des puits témoin cellulaire ne se déposent pas en un culot bien formé, tester les points suivants comme causes possibles : formulation incorrecte du PBS, évaporation excessive à partir des plaques, érythrocytes trop vieux, ou concentration incorrecte d'érythrocytes.

- **Test d'inhibition de la neuraminidase**

L'identification du sous-type basée sur le test d'inhibition de la neuraminidase (IN) n'est pas du ressort de nombreux laboratoires. Les laboratoires de référence doivent être consultés pour le typage N des isolats.

c) Épreuve d'immunofluorescence

- i) Cette technique peut être utilisée sur des coupes de tissu, sur des tapis cellulaires recouvrant des lames, des lamelles, ou des plaques à 96 puits infectés. Des témoins positifs et négatifs doivent être inclus dans tous les protocoles de marquage ;
- ii) Les cellules inoculées sont incubées pendant une durée de temps appropriée pour que 10 à 25 % d'entre-elles soient infectées par le virus. Rincer la lamelle ou la lame une fois dans du PBS, la placer dans 100 % d'acétone pendant 5 à 10 min et sécher à l'air. L'acétone doit être utilisée sous hotte ventilée ;
- iii) Préparer les coupes de tissu congelé sur des lames de verre. Fixer les lames de verre à l'acétone pendant 5 à 10 min et sécher à l'air ;
- iv) Déposer le conjugué (anticorps anti-virus influenza porcin couplé à la fluorescéine) et incuber en chambre humide à 37 °C pendant 30 min ; il est préférable d'utiliser un conjugué contenant du bleu d'Evans pour la contre-coloration ;
- v) Laver dans du PBS, pH 7,2, faire tremper pendant 5 à 10 min dans du PBS frais, rincer à l'eau distillée et sécher à l'air ;
- vi) Déposer des lamelles sur les lames de verre, face cellule en bas, avec du milieu de montage. Enlever le joint d'étanchéité en caoutchouc des chambres de culture sur lame et ajouter du milieu de montage puis une lamelle de verre. Les coupes de tissu sur lame sont également recouvertes de milieu de montage et de lamelle ; si des plaques à 96 puits sont utilisées, le milieu de montage et les lamelles ne sont pas nécessaires ;
- vii) Observer les lames marquées dans une chambre noire au microscope à épifluorescence. Les cellules infectées par du SIV sont identifiées par la présence d'une fluorescence brillante vert pomme. Il est recommandé que la personne qui examine les lames soit entraînée à la lecture de lames marquées en fluorescence, car celles-ci peuvent être difficiles à interpréter. Il est important d'utiliser un anticorps qui reconnaisse tous les virus qui circulent dans la région (c-à-d un anticorps anti-nucléoprotéine de type A).

d) Immunohistochimie (36)

- i) Découper en sections de 4 µm d'épaisseur des échantillons de poumon préalablement fixés au formol et inclus dans de la paraffine, et les placer sur des lames recouvertes de poly-L-lysine. Des tissus témoins positifs et négatifs doivent être inclus dans tous les tests ;
- ii) Chauffer les lames à 60 °C pendant 15 min, déparaffiner et réhydrater par immersion dans des concentrations décroissantes d'éthanol puis dans de l'eau distillée ;
- iii) Traiter les échantillons au peroxyde d'hydrogène à 3 % pendant 10 min et rincer 2 fois à l'eau distillée ;
- iv) Digérer les échantillons avec 0,05 % de protéase pendant 2 min et rincer 2 fois 2 min à température ambiante dans du tampon PBS contenant 0,1 M de Tris, pH 7,2 ;

- v) Déposer l'anticorps monoclonal de souris anti-SIV (dirigé contre la nucléoprotéine virale) sur chaque lame et incuber à température ambiante pendant 1 h ou à 4 °C pendant la nuit. Rincer les lames avec du tampon PBS/Tris ;
- vi) Déposer l'anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti-souris biotinylé) pendant 10 min à température ambiante. Rincer avec du tampon PBS/Tris ;
- vii) Déposer l'anticorps tertiaire (streptavidine conjuguée à la peroxydase) pendant 10 min à température ambiante. Rincer avec du tampon PBS/Tris ;
- viii) Ajouter une solution de tétrahydrochlorure de diaminobenzidine pendant 5 min à température ambiante. Rincer 2 fois à l'eau distillée ;
- ix) Contre-colorer les lames dans de l'hématoxyline de Gill pendant 10 à 30 s, laver à l'eau pendant 2 min, déshydrater, clarifier et ajouter les lamelles ;
- x) Les tissus infectés par le SIV sont identifiés par la présence de marquage brun dans l'épithélium bronchique et dans les pneumocytes.

e) ELISA de capture d'antigène

Des épreuves immuno-enzymatiques (ELISA) de capture d'antigènes de type A sont disponibles dans le commerce pour la détection des virus influenza humains et animaux. Ce genre d'essais a été utilisé pour la détection du SIV dans le tissu pulmonaire et les écouillons nasaux (19, 33). Les tests sont généralement disponibles auprès de compagnies pharmaceutiques.

f) Réaction de polymérisation en chaîne par polymérase (PCR)

Des RT-PCR ont été développées pour le diagnostic de la grippe porcine (8, 17). Des informations approfondies sur la validation de ces épreuves ne sont pas disponibles à l'heure actuelle.

2. Épreuves sérologiques

La principale épreuve sérologique pour la détection des anticorps anti-SIV est l'IHA et elle est spécifique du sous-type. Elle doit être conduite sur des paires de sérums collectés à 10-21 jours d'intervalle. Une augmentation du titre de 4 fois ou plus, entre le premier et le second prélèvement, suggère une infection SIV récente. Les autres épreuves sérologiques qui ont été décrites, mais qui ne sont pas couramment utilisées, sont la neutralisation virale, le test d'immunodiffusion en gélose et l'épreuve d'immunofluorescence indirecte. La technologie ELISA pour la détection des anticorps anti-SIV a été décrite dans la littérature et des kits de diagnostic ont été développés et mis sur le marché. La validation de ces kits ELISA est en cours.

• Test d'inhibition de l'hémagglutination

- i) Diluer les antigènes HA de référence (H1, H3, etc.) à une concentration de 4 à 8 HAU/25 µl dans du PBS 0,01 M, pH 7,2 ;
- ii) Test *H1N1* : inactiver les sérums à la chaleur pendant 30 min à 56 °C. Diluer au 1/10 dans du PBS. À 1 ml de sérum inactivé à la chaleur et dilué, ajouter 0,1 ml d'érythrocytes de poulet concentrés et lavés. Mélanger. Incuber à température ambiante pendant 30 min en agitant régulièrement toutes les 10 à 15 min. Centrifuger à 800 *g* pendant 10 min à 4 °C. Remarque : les sérums peuvent être traités au RDE et aux érythrocytes comme décrit à l'étape iii) ci-dessous au lieu d'être inactivés à la chaleur et traités aux érythrocytes ;
- iii) Test *H1N2* et *H3N2* : ajouter 50 µl de sérum à 200 µl de RDE dilué au 1/10 dans une solution saline de calcium équivalant à 100 unités par ml. Incuber toute la nuit (12 à 18 h) dans un bain-marie à 37 °C. Ajouter 150 µl de solution de citrate de sodium à 2,5 % et inactiver à la chaleur à 56 °C pendant 30 min. Mélanger 200 µl d'échantillon traité et 25 µl de PBS. Ajouter 50 µl d'une solution d'érythrocytes. Agiter et incuber pendant 30 min à température ambiante ou une nuit à 4 °C. Centrifuger à 800 *g* pendant 10 min à 4 °C ;
- iv) Distribuer 50 µl de sérum traité dans 2 puits d'une plaque de 96 puits à fond en V ou en U. Distribuer 25 µl de sérum traité dans 2 puits qui serviront de sérum témoin. Les sérums témoin positif et négatif sont traités de la même manière que les sérums inconnus ;
- v) Distribuer 25 µl de PBS dans les puits témoin pour le sérum et dans tous les puits vides, à l'exception de 2 puits identifiés comme puits témoin cellulaire. Ajouter 50 µl de PBS dans ces puits témoins cellulaires ;
- vi) Diluer le sérum en série dans la plaque, de 2 en 2, sous 25 µl de volume, puis ajouter 25 µl d'antigène approprié dans tous les puits du test, à l'exception des puits témoins pour le sérum et les cellules ;

- vii) Recouvrir les plaques et incuber à température ambiante pendant 30 à 60 min ;
- viii) Ajouter 50 µl de suspension d'érythrocytes à 0,5 % (poulet pour H1N1 et dindon pour H3N2) dans chaque puits, agiter et incuber à température ambiante pendant 20 à 30 min jusqu'à ce qu'un culot distinct se forme au fond des puits témoin cellulaire. Bien maintenir les érythrocytes en suspension pendant la phase de distribution ;
- ix) Préalablement et simultanément à l'IHA, réaliser un test HA sur les antigènes utilisés en IHA afin de vérifier que leurs concentrations sont appropriées ;
- x) Pour que le test soit valide, il ne doit pas y avoir d'hémagglutination dans les puits témoins pour le sérum, pas d'inhibition de l'hémagglutination avec le sérum négatif, le sérum positif doit fournir le titre IHA attendu et le titrage HA de contrôle doit indiquer 4 à 8 HAU pour 25 µl.

b) Épreuve immuno-enzymatique (ELISA) (18)

La technologie ELISA pour la détection des anticorps SIV a été décrite dans la littérature et des kits ELISA sont disponibles dans le commerce.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Des lignes directrices pour la fabrication des vaccins vétérinaires sont données dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ci-dessous et dans le Chapitre 1.1.8. sont volontairement de nature générale et peuvent être complétées par des exigences nationales et régionales.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

L'identité de la semence doit être bien documentée, incluant la source et l'historique de passage de l'organisme. Toutes les caractéristiques d'identification, telles que le sous-type de l'hémagglutinine et de la neuraminidase doivent être établies. L'inhibition de l'hémagglutination et l'inhibition de la neuraminidase par des antisérums spécifiques du sous-type ou la RT-PCR et le séquençage peuvent être utilisés pour établir les sous-types H et N. De même, des aliquotes de la semence virale primaire peuvent être neutralisées par un antisérum spécifique, i.e. un antisérum produit contre un SIV de sous-type H1N1 ou H3N2, puis inoculées dans le sac allantoïdien d'œufs de poule embryonnés de 10 jours d'âge, ou sur lignées cellulaires permissives telles que la lignée cellulaire MDCK. Le liquide allantoïdien ou le surnageant de culture cellulaire est prélevé 72 à 96 h post-inoculation et testé vis-à-vis de l'activité HA. L'identité est démontrée par la perte d'activité HA pour la semence neutralisée et la présence d'activité HA pour la semence non neutralisée. Des différences antigéniques significatives révélées pour une souche donnée, qui la mettent à part des autres membres de son sous-type, et qui pourraient prétendre avoir un impact bénéfique sur son utilisation comme vaccin, doivent être confirmées.

b) Méthode de culture

La semence primaire de SIV peut être multipliée sur œufs ou en culture cellulaire. La sélection d'une méthode de culture dépend du degré d'adaptation du virus, de la croissance dans le milieu, du taux de mutation et du rendement viral dans le système de culture spécifique. Les produits vaccinaux de SIV ne doivent pas résulter de plus de 5 passages à partir de la MSV, afin d'éviter les variations antigéniques ou génétiques.

c) Validation de la culture

La pureté de la semence et des cellules à utiliser pour la production de vaccin doit être démontrée. Le MSV doit être montré exempt d'agents adventices, bactéries ou mycoplasmes, par des tests reconnus sensibles pour la détection de ces microorganismes. L'aliquot testé doit être représentatif d'un titre viral adéquat pour la production de vaccin, mais pas trop fort pour que la semence virale puisse être neutralisée par les antisérums hyperimmuns pendant la phase de test de sa pureté. La semence virale est neutralisée par un antisérum monospécifique ou un anticorps monoclonal anti-SIV et le mélange virus/anticorps est cultivé sur plusieurs types de monocouches de lignées cellulaires. Les cultures sont repiquées à 7 jours d'intervalle pendant au moins 14 jours, puis testées vis-à-vis d'agents cytopathogènes et hémasorbants. Les cellules sont également examinées vis-à-vis de virus adventices qui pourraient avoir infecté les cellules ou la semence au cours de passages précédents. Les contaminants potentiels incluent le virus de la diarrhée

virale bovine, le reovirus, le virus de la rage, le virus de la maladie d'Aujeszky (pseudorage), le virus de la gastro-entérite transmissible, le coronavirus respiratoire porcin, le parvovirus porcin, l'adénovirus porcin, l'entérovirus de la maladie de Teschen-Talfan, le rotavirus porcin, le circovirus porcin et le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin. Les lignées cellulaires sur lesquelles la semence est testée incluent : une lignée (Vero) de cellules de rein du singe vert d'Afrique (virus rabique et reovirus), une lignée de cellules de porc, une lignée cellulaire des mêmes espèces que celles dont des cellules ont été utilisées pour l'amplification de la semence, sinon d'origine porcine, et des lignées cellulaires de toute autre espèce sur laquelle la semence a été passée. De plus, une lignée cellulaire hautement permissive pour le virus de la diarrhée virale bovine, de type 1 et 2, est recommandée. Le virus de la diarrhée virale bovine est un contaminant potentiel introduit via l'utilisation de sérum de fœtus de bovin dans les systèmes de culture cellulaire.

Les facteurs pouvant contribuer à une instabilité pendant la production, tel que la réplication sur une lignée cellulaire inhabituelle, doivent être recherchés. Si la production est approuvée après 5 passages à partir de la semence primaire, alors le séquençage des gènes codant H et N pourrait être justifié afin de confirmer la stabilité de la semence virale au passage maximum.

d) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Les vaccins candidats doivent être démontrés purs, sans danger, actifs et efficaces.

Les souches utilisées pour la production de vaccins doivent être antigéniquement en rapport avec les souches SIV circulant sur le terrain (6, 11, 34, 35). Les tests d'inhibition de l'hémagglutination et les tests de neutralisation peuvent être utilisés pour la sélection, s'ils démontrent une réactivité croisée des antisérums d'animaux vaccinés avec la souche vaccinale candidate et les isolats de terrain actuels. Une étude de vaccination/infection chez le porc, en utilisant des souches infectieuses homologues et hétérologues, indiqueront le degré de protection conféré par le vaccin. Les porcs utilisés dans les études de vaccination/infection devront être exempts d'anticorps dirigés contre le SIV avant le début de l'expérience. Les études de vaccination/infection devront être menées en utilisant du virus produit par la méthode d'amplification adéquate, au nombre de passages maximal permis et en utilisant des porcs de l'âge minimum recommandé indiqué sur la notice. Au départ, les lots sont formulés pour contenir différentes quantités d'antigène viral. Le lot test contenant la plus faible quantité d'antigène qui induit une protection devient le lot de référence contre lequel les lots des futures productions seront mesurés. Le critère le plus valable pour l'essai d'évaluation en aveugle de groupes traités est la réduction statistiquement significative du virus (titres et durée d'excrétion) dans le tractus respiratoire des porcs vaccinés. Des différences au niveau des observations cliniques et des lésions pulmonaires font aussi partie des critères utilisés pour la validation d'un essai. Si des tests *in vivo* ou *in vitro* doivent être utilisés pour déterminer l'efficacité de chaque lot de production de vaccin, ces essais doivent être conduits en accord avec les études d'antigène minimum afin d'établir le critère de libération. Des vaccins combinés contenant plus d'une souche de SIV sont disponibles dans quelques pays. L'efficacité des différents composants de ces vaccins doit être établie pour chacun d'eux indépendamment, puis en tant que combinaison au cas où une interférence entre les différents antigènes existerait.

2. Méthode de fabrication

Une fois que le vaccin est démontré être efficace, et que les conditions proposées pour la production sont acceptables pour les autorités réglementaires, un agrément doit être délivré pour la fabrication du vaccin. Généralement, des systèmes cellulaires en grand volume, en suspension ou en monocouche, sont exploités sous contrôle stricte de la température, en conditions aseptiques et selon des méthodes de production définies, afin d'assurer une constance inter-lot. Quand le virus a atteint son titre maximal, déterminé par HA, ECP, épreuve d'immunofluorescence ou une autre technique reconnue, le virus est clarifié, filtré et inactivé. Plusieurs agents, dont le formol et l'éthylèneimine binaire, ont été utilisés avec succès pour l'inactivation. Une étude des cinétiques d'inactivation par l'agent d'inactivation retenu doit être conduite sur un lot de virus ayant un titre plus élevé que le titre maximum de production, et ayant été multiplié selon la méthode de production approuvée. Cette étude doit démontrer que la méthode d'inactivation assure l'inactivation complète du virus. Des échantillons prélevés à des intervalles de temps réguliers pendant l'inactivation, puis inoculés sur une lignée cellulaire susceptible ou dans le sac allantoïdien d'œufs embryonnés, doit indiquer une perte linéaire et complète du titre à la fin du processus d'inactivation. Ceci équivaut à moins d'une particule infectieuse pour 10^4 litres de fluide après inactivation. Habituellement, de l'adjuvant est additionné pour augmenter la réponse immunitaire.

3. Contrôles en cours de fabrication

Les cultures cellulaires doivent être contrôlées au niveau macroscopique, vis-à-vis d'anormalités ou de signes de contamination et éliminées si non satisfaisantes. Un lot est prêt à être récupéré quand l'ECP viral a atteint 80 à 90 %. La concentration de virus peut être évaluée par les tests antigéniques ou tests d'infection.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Pendant la production, des tests vis-à-vis des contaminations bactériennes, mycoplasmaïques et fongiques doivent être conduits sur les 2 lots de vaccins récupérés, inactivé et vivant, et confirmés sur les produits finaux (voir Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »).

b) Innocuité

Des souris ou des cobayes peuvent être utilisés pour évaluer l'innocuité d'un produit inactivé. Dans un modèle, 8 souris sont inoculées avec 0,5 ml, par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée, et observées pendant 7 jours. Le test d'innocuité chez la souris ne peut être mis en œuvre quand certains types d'adjuvants sont utilisés, notamment les produits à base de saponine. Dans l'autre modèle, 2 hamsters reçoivent chacun l'injection d'une dose de 2 ml, par voie intramusculaire ou par voie sous-cutanée, et sont observés pendant 7 jours. Des signes cliniques ou une mortalité pouvant être attribués au vaccin indiquent que le lot en question ne peut être utilisé. L'inactivation virale complète dans un produit tué peut être vérifiée par passages multiples, en culture cellulaire ou sur œufs, des fluides produits après inactivation, mais avant adjonction d'adjuvant, passages suivis d'un test d'HA pour évaluer la présence de virus.

Le produit final peut être évalué chez l'animal hôte, dans un essai comportant 2 animaux d'âge minimum recommandé pour la vaccination, selon les instructions données sur la notice. Les animaux sont observés pendant 21 jours. Des études d'innocuité sur animaux vaccinés du terrain sont également recommandées, dans au moins 3 zones géographiques différentes, avec au moins 300 animaux par zone. Si le vaccin est utilisé chez des porcs destinés au marché et réservés à la consommation humaine, une durée de quarantaine adéquate en fonction de l'adjuvant utilisé (généralement 21 à 60 jours), doit être établie au moyen des résultats d'analyses histopathologiques soumis aux autorités réglementaires adéquates en matière de sécurité sanitaire des aliments.

c) Activité

Pendant la production, la quantité d'antigène est mesurée afin de vérifier que les titres minimum approximatifs ont été atteints. Le taux d'antigène est généralement mesuré avant l'inactivation et avant d'être davantage préparé. Les tests de mesure de quantités relatives, ELISA, HA et IHA, font partie des essais qui peuvent être utilisés pour déterminer la teneur en antigène dans le produit final. Il est nécessaire de confirmer la sensibilité, la spécificité, la reproductibilité et la robustesse de tels tests.

d) Durée de l'immunité

La durée de l'immunité et la fréquence de vaccination recommandée pour un vaccin doivent être déterminées avant qu'un produit ne soit approuvé. Initialement, cette information est obtenue par des études de vaccination/infection chez l'animal hôte. La période de protection démontrée, mesurée par la capacité des animaux vaccinés à surmonter l'infection dans un test validé, peut être indiquée dans les recommandations trouvées sur la notice du vaccin. Quand un essai d'activité convenable a été réalisé, mais que le glissement antigénique nécessite le remplacement de certaines souches dans la préparation vaccinale, des souches du même sous-type peuvent être évaluées, soit chez l'animal hôte, soit chez un modèle animal de laboratoire comparable. Cependant, même si les souches en circulation montrent des différences antigéniques significatives par rapport à la souche vaccinale, le vaccin peut tout de même conférer une protection (34). De manière similaire, le vaccin peut ne pas protéger contre une nouvelle souche pourtant antigéniquement similaire au vaccin. Les autres facteurs qui peuvent jouer un rôle sont l'adjuvant et la dose antigénique. En conséquence, il apparaît que l'efficacité des souches vaccinales doit toujours être évaluée chez le porc.

e) Stabilité

Les vaccins doivent être stockés à $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, avec exposition minimale à la lumière ou dans des conditions en accord avec les autorités réglementaires. La durée de conservation doit être déterminée par un test d'activité approuvé (Section C.5.b), au delà de la période de stabilité proposée.

f) Agents de conservation

L'agent de conservation le plus commun est le thimerosol, à une concentration finale n'excédant pas 0,01 % (1/10 000). L'ajout de thimerosol ou tout autre composé contenant du mercure doit être évité si possible. Des antibiotiques peuvent être utilisés comme agents de conservation mais leur emploi est limité selon le type et la quantité d'antibiotique. De même, sont aussi limités les résidus d'antibiotiques provenant

du milieu de culture cellulaire et qui peuvent être présents dans le produit final. Ainsi, la quantité totale de la gentamicine résiduelle et servant d'agent de conservation ne doit pas excéder 30 µg par ml de vaccin.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Les vaccins SIV inactivés ne présentent pas de danger particulier pour l'utilisateur, bien qu'une inoculation accidentelle puisse entraîner une réaction néfaste du fait de l'adjuvant et des composés secondaires du vaccin. Généralement, les porcs en bonne santé, en âge d'engraissement ou plus vieux, et les truies gestantes à tous les stades de gestation, peuvent être vaccinés en toute sécurité par les vaccins SIV inactivés.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Les doses conditionnées de produit fini de vaccins inactivés doivent être testées chez de jeunes souris comme décrits au paragraphe C.4.b.

b) Activité

L'essai d'activité établi au moment de l'étude de protection par la dose minimale d'antigène doit être utilisé pour évaluer les nouveaux lots avant libération. L'essai doit être spécifique et reproductible. Il doit, de façon fiable, détecter les vaccins qui ne sont pas suffisamment puissants. Si la sérologie des animaux de laboratoire est utilisée à la place de la sérologie porcine, il doit d'abord être démontré que la vaccination de l'animal de laboratoire induit une réponse spécifique, sensible et dose-dépendante, comme celle mesurée dans l'essai d'activité et qu'elle est corrélée à la protection chez le porc (Section C.1.d).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BROWN I.H., HARRIS P.A., MCCAULEY J.M. & ALEXANDER D.J. (1998). Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of the H1N2 virus of novel genotype. *J. Gen. Virol.*, **79**, 2947–2955.
2. BROWN I.H., HILL M.L., HARRIS P.A., ALEXANDER D.J. & MCCAULEY J.W. (1997). Genetic characterization of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) isolated from pigs in England. *Arch. Virol.*, **142**, 1045–1050.
3. CASTRUCCI M.R., DONATELLI I., SIDOLI L., BARIGAZZI G., KAWAOKA Y. & WEBSTER R.G. (1993). Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology*, **193**, 503–506.
4. CHOI Y.K., GOYAL S.M., FARNHAM M.W. & JOO H.S. (2002). Phylogenetic analysis of H1N2 isolates of influenza A virus from pigs in the United States. *Virus Res.*, **87**, 173–179.
5. CHOI Y.K., LEE J.H., ERICKSON G., GOYAL S.M., JOO H.S., WEBSTER R.G. & WEBBY R. J. (2004). H3N2 influenza virus transmission from swine to turkeys, United states. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2156–2160.
6. DE JONG J.C., VAN NIEUWSTADT A.P., KIMMAN T.G., LOEFFEN W.L., BESTEBROER T.M., BIJLSMA K., VERWEIJ C., OSTERHAUS A.D. & CLASS E.C. (1999). Antigenic drift in swine influenza H3 haemagglutinins with implications for vaccination policy. *Vaccine*, **17**, 1321–1328.
7. DONE S.H. & BROWN I.H. (1997). Swine influenza in the United Kingdom, past and present. *Large Anim. Pract.*, **2**, 20–28.
8. FOUCHIER R.A., BESTEBROER T.M., HERFST S., VAN DER KEMP L., RIMMELZWAAN G.F. & OSTERHAUS A.D. (2000). Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 4096–4101.
9. GREGORY V., LIM W., CAMERON K., BENNETT M., MAROZIN S., KLIMOV A., HALL H., COX N., HAY A. & LIN Y. P. (2001). Infection of a child in Hong-Kong by an influenza A H3N2 virus closely related to viruses circulating in European pigs. *J. Gen. Virol.*, **82**, 1397–1406.
10. GREGORY V., BENNETT M., THOMAS Y., KAISER L., WUNDERLI W., MATTER H., HAY A. & LIN Y.P. (2003). Human infection by a swine influenza a (H1N1) virus in Switzerland. *Arch. Virol.*, **148**, 793–802.

11. HEINEN P.P., VAN NIEUWSTADT A.P., DE BOER-LUIJTZE E.A. & BIANCHI A.T.J. (2001). Analysis of the quality of protection induced by a porcine influenza A vaccine to challenge with an H3N2 virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **82**, 39–56.
12. ITO T., COUCEIRO J.N.S.S., KELM S., BAUM L.G., KRAUSS S., CASTRUCCI M.R., DONATELLI I., KIDA H., PAULSON J.C., WEBSTER R.G. & KAWAOKA Y. (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol.*, **72**, 7367–7373.
13. KARASIN A.I., BROWN I.H., CARMAN S. & OLSEN C.W. (2000). Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. *J. Virol.*, **74**, 9322–9327.
14. KARASIN A.I., LANDGRAF J., SWENSON S., ERICKSON G., GOYAL S., WOODRUFF M., SCHERBA G., ANDERSON G. & OLSEN C.W. (2002). Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 1073–1079.
15. KARASIN A.I., SCHUTTEN M.M., COOPER L.A., SMITH C.B., SUBBARAO K., ANDERSON G.A., CARMAN S. & OLSEN C.W. (2000). Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977–1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Res.*, **68**, 71–85.
16. KARASIN A.I., WEST K., CARMAN S. & OLSEN C.W. (2004) Characterization of avian H3N3 and H1N1 influenza A viruses isolated from pigs in Canada. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 4349–4354.
17. LANDOLT G., KARASIN A.I., HOFER C., MAHANEY J., SVAREN J. & OLSEN C.W. (2004). Use of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay and cell culture methods for detection of swine influenza A viruses. *Am. J. Vet. Res.*, **66**, 119–124.
18. LEE B.W., BEY R.F., BAARSCH M.J. & EMERY D.A. (1993). Subtype specific ELISA for the detection of antibodies against influenza A H1N1 and H3N2 in swine. *J. Virol. Methods*, **45**, 121–136.
19. LEE B.W., BEY R.F., BAARSCH M.J. & SIMONSON R.R. (1993). ELISA method for detection of influenza A infection in swine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **5**, 510–515.
20. LOEFFEN W.L., KAMP E.M., STOCKHOFF-ZURWIEDEN N., VAN NIEUWSTADT A.P., BONGERS J.H., HUNNEMAN W.A., ELBERS A.R., BAARS J., NELL T. & VAN ZIJDERVELD F.G. (1999). Survey of infectious agents involved in acute respiratory disease in finishing pigs. *Vet. Rec.*, **145**, 123–129.
21. MAROZIN S., GREGORY V., CAMERON K., VALETTE M., AYMARD M., FONI E., BARIGAZZI G., LIN Y. & HAY A. (2002) Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. *J. Gen. Virol.*, **83**, 735–745.
22. MYERS K.P., OLSEN C.W., & GRAY G.C. (2007). Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, **44**, 1084–1088.
23. NOBLE S., MCGREGOR M.S., WENTWORTH D.E. & HINSHAW V.S. (1993). Antigenic and genetic conservation of the haemagglutinin in H1N1 swine influenza viruses. *J. Gen. Virol.*, **74**, 8243–8251.
24. OLSEN C.W. (2002). Emergence of novel strains of swine influenza virus in North America, *In: Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, Morilla A., Yoon K.J. & Zimmerman J.J., eds. Iowa State University Press, Iowa, USA, 37–43.
25. OLSEN C.W., BRAMMER L., EASTERDAY B.C., ARDEN N., BELAY E., BAKER I. & COX N. J. (2002). Serologic evidence of H1 swine influenza virus infection in swine farm residents and employees. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 814–815.
26. OLSEN C.W., BROWN I., EASTERDAY B.C. & VAN REETH K. (2005). Swine Influenza. *In: Diseases of Swine*, Straw B., D’Allaire S., Zimmerman J. & Taylor D., eds. Iowa State University Press, Iowa, USA, 469–482.
27. OLSEN C.W., KARASIN A. & ERICKSON G. (2003). Characterization of a swine-like reassortant H1N2 influenza virus isolated from a wild duck in the United States. *Virus Res.*, **93**, 115–121.
28. PEIRIS J. S. M., GUAN Y., MARKWELL D., GHOSE P., WEBSTER R. G. & SHORTRIDGE K. F. (2001) Cocirculation of avian H9N2 and contemporary “human” H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment. *J. Virol.*, **75**, 9679–9686.
29. SCHRADER C. & SÜSS J. (2004) Molecular epidemiology of porcine H3N2 influenza viruses isolated in Germany between 1982 and 2001. *Intervirology*, **47**, 72–77.

30. SENNE D.A. (1998). Virus propagation in embryonating eggs. *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, 235–240.
31. SHEERAR M.G., EASTERDAY B.C. & HINSHAW V.S. (1989). Antigenic conservation of H1N1 swine influenza viruses. *J. Gen. Virol.*, **70**, 3297–3303.
32. SHOPE R.E. (1931). Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology. *J. Exp. Med.*, **54**, 373–380.
33. SWENSON S.L., VINCENT L.L., LUTE B.M., JANKE B.H., LECHTENBERG K.E., LANDGRAF J.G., SCHMITT B.J., KINKER D.R. & McMILLEN J.K. (2001). A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 36–42.
34. VAN REETH K., LABARQUE G., DE CLERCQ S. & Pensaert M. (2001). Efficacy of vaccination of pigs with different H1N1 swine influenza viruses using a recent challenge strain and different parameters of protection. *Vaccine*, **19**, 4479–4486.
35. VAN REETH K., VAN GUCHT S. & Pensaert M. (2003). Investigations of the efficacy of European H1N1- and H3N2-based swine influenza vaccines against the novel H1N2 subtype. *Vet. Rec.*, **153**, 9–13.
36. VINCENT L.L., JANKE B.H., PAUL P.S. & HALBUR P.G. (1997). A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 191–195.
37. WEBBY R.J., SWENSON S.L., KRAUSS S.L., GERRISH P.J., GOYAL S.M. & WEBSTER R.G. (2000). Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J. Virol.*, **74**, 8243–8251.
38. WEBBY R.J., ROSSOW K., ERICKSON G., SIMS Y. & WEBSTER R. (2004). Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. *Virus Res.*, **103**, 67–73.
39. ZHOU N.N., SENNE D.A., LANDGRAF J.S., SWENSON S.L., ERICKSON G., ROSSOW K., LIU L., YOON K.J., KRAUSS S. & WEBSTER R.G. (1999). Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J. Virol.*, **73**, 8851–8856.

*
* *

MALADIE VÉSICULEUSE DU PORC

RÉSUMÉ

La maladie vésiculeuse du porc (MV) est une maladie contagieuse du porc, due à un entérovirus. Elle se caractérise par l'apparition de vésicules au niveau du bourrelet podal, des coussinets plantaires, et parfois au niveau des lèvres, de la langue, du groin, et des tétines. La virulence des souches de virus de la MV est variable : la maladie peut être subclinique, bénigne ou grave. Les cas graves ne surviennent en général que dans les porcheries humides avec un sol abrasif. La MV revêt une importance particulière du fait qu'on ne peut la distinguer de la fièvre aphteuse (FA). Toute affection vésiculeuse chez le porc doit être attribuée à la fièvre aphteuse jusqu'à ce que des épreuves au laboratoire apportent la preuve du contraire. Cependant, les infections inapparentes ont été les plus fréquemment observées au cours des dernières années.

Identification de l'agent pathogène : *un diagnostic positif peut être établi en mettant en évidence par une méthode immuno-enzymatique (ELISA), la présence d'antigène viral MV dans un prélèvement de vésicule ou de liquide vésiculeux. Si la quantité de vésicule prélevée soumise au test est insuffisante (moins de 0,5 g), si les résultats du test sont négatifs ou s'ils ne permettent pas de conclure, on peut utiliser des techniques plus sensibles telles que la transcription reverse associée à une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) ou l'isolement du virus sur cultures de cellules de porc. Si un effet cytopathogène (ECP) se manifeste dans l'une des cultures de cellules, on procédera à la mise en évidence de l'antigène viral du MV à l'aide d'un ELISA ou par RT-PCR. Les infections inapparentes peuvent être détectées sur des échantillons de matières fécales prélevés au hasard sur les sols des porcheries suivis de l'identification du génome viral par RT-PCR ou isolement.*

Épreuves sérologiques : *les épreuves sérologiques peuvent être utilisées pour confirmer le diagnostic de cas cliniques ou pour dépister des infections inapparentes. La détection des anticorps spécifiques du virus MV peut s'effectuer grâce à une épreuve de microséroneutralisation virale ou à un test ELISA. Bien que le test de séroneutralisation exige 2 à 3 jours, il reste l'épreuve de référence pour l'identification des anticorps anti-virus MV. Une petite proportion (jusqu'à 0,1 %) de porcs sains, non-infectés réagissent positivement aux épreuves sérologiques pour la MV. La réactivité de ces cas uniques est transitoire et ils ne peuvent donc être différenciés des porcs infectés qu'en prélevant de nouveau l'animal positif et sa cohorte.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *il n'existe aucun vaccin contre la MV actuellement disponible sur le marché. Il est possible de se procurer les réactifs de diagnostic de référence auprès des laboratoires de références régionaux.*

A. INTRODUCTION

La maladie vésiculeuse du porc (MV) se manifeste par un état vésiculeux subclinique, bénin ou grave, dépendant du type de la souche virale impliquée, de la charge virale et de la voie empruntée par l'infection et des conditions d'élevage dans lesquelles les porcs sont maintenus. Cliniquement, il est impossible de différencier la MV de la fièvre aphteuse (FA), ce qui est un point crucial. Un diagnostic expérimental permettant de les différencier doit donc être effectué dans les plus brefs délais. Des foyers récents de MV ont été caractérisés par des signes cliniques bénins voire par l'absence de signes cliniques ; l'infection a été détectée lors du traitement d'échantillons prélevés soit dans le cadre de programmes de séro-surveillance, soit en vue de la certification pour l'exportation.

La période d'incubation de la MV varie de 2 à 7 jours, après laquelle une fièvre transitoire pouvant atteindre 41 °C peut apparaître. Des vésicules apparaissent ensuite sur le bourrelet podal au niveau de la jonction avec les coussinets plantaires. Cet état peut se généraliser à l'ensemble du bourrelet podal, provoquant ainsi la chute de

l'onglon. Les vésicules apparaissent plus rarement sur le groin, plus particulièrement sur la face dorsale, sur les lèvres, sur la langue et les tétines, des érosions peuvent apparaître au niveau des genoux. Les porcs affectés par la maladie peuvent boiter et refuser de s'alimenter pendant plusieurs jours. L'avortement ne constitue pas un trait caractéristique de la MV. La guérison est généralement complète au bout de 2 ou 3 semaines. La seule trace subsistant après l'infection est une ligne sombre et horizontale sur l'onglon, dont la croissance a été momentanément interrompue. Plusieurs critères influencent les signes cliniques, à savoir l'âge de l'animal, les conditions dans lesquelles il est élevé, et la souche du virus de la MV impliquée (13). Les maladies dues à une souche de virus peu virulente peuvent passer inaperçues, c'est souvent le cas pour les porcs élevés en extérieur sur de l'herbe, ou dans des porcheries dont le sol est recouvert par un épais tapis de paille. La maladie affecte plus sévèrement les jeunes animaux même si les cas mortels restent rares, à la différence des cas de FA dans les élevages de jeunes animaux. Des signes nerveux ont déjà été constatés, mais ils constituent des exceptions. Les porcs affectés par la maladie excrètent le virus par le nez, la bouche et par les fèces jusqu'à 48 h avant le début des signes cliniques. La plus grande partie du virus est produite au cours des 7 premiers jours suivant l'infection, les excréments nasale et buccale disparaîtront normalement au bout de 2 semaines. Toutefois, le virus peut être retrouvé dans les fèces pendant encore 3 mois. Le virus de la MV peut aussi rester présent dans le tissu nécrotique associé aux vésicules rompues. Dans le milieu extérieur, le virus de la MV est particulièrement résistant à l'inactivation, et reste stable à des pH compris entre 2,5 et 12 (14). Le virus FA est différent puisqu'il est labile en dehors de la zone de pH comprise entre 6 et 8.

Du fait du caractère bénin ou subclinique éventuel de la MV, l'analyse de prélèvements provenant d'animaux suspects doit toujours s'accompagner de l'analyse de prélèvements de sérums provenant à la fois des animaux suspectés et d'autres animaux apparemment non-infectés de la porcherie. La MV est susceptible de circuler sans qu'on la remarque, jusqu'à ce qu'elle affecte un groupe d'animaux plus sensibles. La recherche d'une augmentation du titre du virus de la MV sur des animaux apparemment sains est donc nécessaire afin de pouvoir déterminer depuis quand l'infection est présente. De même, la détermination de l'isotype des immunoglobulines (M ou G) dirigées contre le virus de la MV peut aider à estimer le moment de la contamination.

La MV est cliniquement très semblable à la fièvre aphteuse. Les prélèvements servant à isoler le virus ou à détecter des antigènes doivent être manipulés et testés dans l'hypothèse qu'ils contiennent le virus de la fièvre aphteuse. Leur milieu de transport doit être composé d'une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) et de glycérol (1/1), pH 7,2 à 7,6, ainsi que d'antibiotiques tels que – en concentration finale par ml – la pénicilline (1 000 unités internationales [UI]), le sulfate de néomycine (100 UI), le sulfate de polymyxine B (50 UI), et la mycostatine (100 UI) (10).

Le virus de la MV est un entérovirus du porc appartenant à la famille des *Picornaviridae*. Il n'existe qu'un seul sérotype avec 4 variants antigéniques/génomiques que l'on peut différencier (2). Le virus de la MV est apparenté sur le plan antigénique au virus humain coxsackie B5. Des rapports ont fait état de cas de séroconversion au virus de la MV chez des employés de laboratoire manipulant cet agent pathogène. Des cas cliniques de maladies bénignes ont été décrits avec un cas isolé de méningite associée à une infection par le virus de la MV. Cependant il n'existe pas de cas connus de séroconversion chez les éleveurs ou les vétérinaires travaillant en contact avec des porcs infectés. La transmission du virus coxsackie B5 entre porcs n'a pas pu être mise en évidence dans des conditions expérimentales.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Tout affection vésiculeuse du porc peut être un cas de fièvre aphteuse. Une fois cette hypothèse écartée, le diagnostic de la MV nécessite l'équipement d'un laboratoire spécialisé. Les pays ne disposant pas de tels équipements, peuvent envoyer leurs prélèvements à un Laboratoire de référence de l'OIE pour la MV¹ pour qu'ils soient examinés. Sur le continent américain, une épreuve parallèle de recherche d'antigène viral de la stomatite vésiculeuse doit aussi être effectué.

La détection des antigènes ou du génome du virus de la MV grâce à un test immuno-enzymatique (ELISA) ou une transcription réverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) a la même valeur diagnostique que l'isolement du virus. Du fait de leur rapidité, l'ELISA et la RT-PCR sont des tests très pratiques pour le criblage. Cependant, l'isolement du virus reste la technique de référence et doit être mis en œuvre sur les échantillons ayant donné des réponses positives en ELISA ou RT-PCR en l'absence i) de signes cliniques, ii) de détection de porcs séropositifs ou iii) de rapport épidémiologique direct avec un foyer confirmé.

1 Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, Working, Surrey GU24 0NF, Royaume-Uni (Laboratoire de référence de l'OIE pour la fièvre aphteuse et la MV et également Laboratoire de référence international de la FAO [Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture] pour la Fièvre Aphteuse) ; Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Brescia, Via Bianchi 9, Italie.

En cas de signes cliniques, la recherche du virus doit commencer par l'analyse d'une suspension de lésion prélevée et diluée à 10 % en PBS. Les échantillons de matière fécale sont les prélèvements de choix lorsque des infections inapparentes sont suspectées. Les fèces peuvent être prélevées sur des porcs ou sur le sol des bâtiments abritant, ou ayant abrité, des porcs infectés par le virus de la MV. Le titre des virus dans les fèces est en général trop faible pour que celui-ci soit détecté par ELISA, et les épreuves de RT-PCR et d'isolement du virus sont nécessaires. Dans un nombre de cas significatif, d'autres entérovirus vont se multiplier lorsque des échantillons de matière fécale sont inoculés à des cultures cellulaires. Il est possible de les différencier du virus de la MV par ELISA ou RT-PCR ; néanmoins, ils peuvent supplanter le virus de la MV si celui-ci est aussi présent et donner de faux résultats négatifs.

- **Préparation des échantillons**

Lésion : une suspension est préparée en broyant le matériel de lésion à l'aide d'un pilon dans un mortier contenant du sable stérile et un peu de milieu de culture et des antibiotiques. Plus de milieu est ensuite ajouté afin d'obtenir une suspension d'environ 10 %. La suspension est clarifiée par centrifugation à 10 000 tr/min pendant 20 à 30 min et le surnageant est récolté.

Fèces : environ 20 g de matières fécales sont remis en suspension dans un minimum de milieu de culture ou de tampon phosphate (0,04 M) (PBS). La suspension est homogénéisée par agitation puis clarifiée par centrifugation à 10 000 tr/min pendant 20 à 30 min ; le surnageant est récolté et filtré sur un filtre de 0,45 µm.

- a) **Isolement du virus**

Une certaine quantité de suspension épithéliale ou fécale est ensemencée après clarification sur des monocouches de cellules IB-RS-2 ou d'autres cellules porcines sensibles cultivées dans des flacons appropriés (flacons de 25 cm², tubes roulants, ou plaques à 6, 12 ou 24 puits). Il convient d'employer des systèmes de culture de cellules bovines afin de pouvoir effectuer un diagnostic différentiel (par exemple pour la fièvre aphteuse). En général, le virus de la MV se multipliera uniquement sur des cellules d'origine porcine, mais il a été rapporté des isollements sur des cellules de rein d'agneau. Le milieu jugé est supplémenté avec 10 % de sérum bovin pour la croissance des cellules, avec 3 % de sérum bovin pour l'entretien, et des antibiotiques.

On contrôle l'évolution des cultures tous les jours. Si, un effet cytopathogène (ECP) est observé, on récolte le surnageant et l'identification du virus est réalisée par ELISA (ou tout autre test approprié, par ex. la RT-PCR). Les cultures où ne s'est manifesté aucun ECP font l'objet de passages aveugles après 48 ou 72 h, et sont observées pendant encore 2 à 3 jours supplémentaires. Si aucun ECP n'est visible après le deuxième passage, l'échantillon est enregistré « PVD » (pas de virus détecté). Lorsque le virus est isolé à partir de fèces dans lesquelles la charge virale peut être faible, un 3^e passage sur culture cellulaire peut être nécessaire.

- b) **Méthodes immunologiques**

- **Méthode immuno-enzymatique**

La détection de l'antigène viral de la MV par un ELISA sandwich indirect a remplacé la fixation du complément. Ce test est le même que celui utilisé pour le diagnostic de la fièvre aphteuse. Les puits des plaques de microtitrage sont saturées d'antisérum de lapin contre le virus de la MV. C'est le sérum de capture. Les suspensions de prélèvements à tester sont ajoutées et mises à incuber. On procède aux contrôles de rigueur. L'étape suivante comprend l'addition de sérum révélateur de cobaye puis d'un sérum de lapin anti-cobaye conjugué à de la peroxydase. On procède à un lavage complet entre chaque étape afin d'éliminer les réactifs en excès. Un changement de couleur lors de l'addition du chromogène (par ex. l'orthophénylènediamine) et du substrat (H₂O₂) indique une réaction positive. Ce changement de couleur est visible à l'oeil nu lorsqu'il s'agit de réactions positives fortes. Les autres réactions sont lues par spectrophotométrie à la longueur d'onde appropriée et considérées comme positives si l'absorption est ≥ 0,1 par rapport au bruit de fond. Comme alternative aux anti-sérums de cobaye et de lapin, des anticorps monoclonaux (AcMs) appropriés peuvent être utilisés, en étant fixés à la plaque ELISA comme anticorps de capture, ou conjugués à la peroxydase comme anticorps de révélation.

On peut utiliser un test ELISA basé sur l'AcM dans le but d'étudier les variations antigéniques au sein des souches virales MV. Les souches virales cultivées en culture tissulaire sont piégées par le sérum hyperimmun anti-virus de la MV de lapin, qui est adsorbé sur la phase solide. On fait ensuite réagir différents AcMs correspondants, et la liaison des AcMs aux espèces sauvages est comparée aux espèces parentales. Une forte liaison indique la présence d'épitopes partagés entre les espèces parentales et les espèces sauvages (2).

c) Méthodes de reconnaissance de l'acide nucléique

Une transcription réverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) est une technique utile pour détecter le génome du virus de la MV dans une grande gamme d'échantillons provenant de cas cliniques ou inapparents. Plusieurs méthodes ont été décrites (3, 7, 12, 15-18), qui utilisent différentes techniques d'extraction de l'ARN, qui ciblent différentes parties du génome viral et qui utilisent différentes approches pour détecter les produits d'amplification. Dans le cas d'échantillons de fèces, une technique d'immunocapture utilisant un anticorps monoclonal spécifique du virus de la MV s'est révélée efficace (7). Cette méthode (décrite ci-dessous) convient aux laboratoires dépourvus d'équipements sophistiqués pour la détection en temps réel des produits d'amplification ADN, mais quand ces équipements existent, une approche comme celle décrite par Reid *et al.* (16, 17) présente les avantages d'être d'exécution facile et de réduire les risques de contamination par des produits de PCR.

- i) Extraction de l'ARN par immunocapture : sensibiliser les puits d'une plaque ELISA avec une solution de saturation de l'AcM 5B7 (200 µl/puits dilué dans un tampon carbonate-bicarbonate) en incubant pendant une nuit à 4 °C. Laver les plaques 3 fois avec du PBS. Les plaques peuvent être utilisées immédiatement ou conservées à -20 °C pendant 2 à 3 semaines, ou plus si elles sont stabilisées. NOTE : comme alternative à l'extraction par immunocapture, il est possible d'utiliser un kit de diagnostic disponible dans le commerce (comme par exemple, le kit RNeasy de Qiagen).
- ii) Distribuer chaque échantillon (suspension de fèces) dans 3 puits de la plaque sensibilisée avec l'AcM 5B7 (200 µl/puits, 600 µl d'échantillon en tout).
- iii) Après une incubation à 37 °C pendant 1 h en agitation lente, laver les puits 3 fois avec du PBS. Le lavage est réalisé à la main afin d'éviter les contaminations croisées entre les puits.
- iv) L'ARN est extrait de chaque échantillon en ajoutant environ 100 µl/puits de tampon de lyse (4 M de thiocyanate de guanidine, 25 mM de citrate de sodium, pH 7, 0,5 % de Sarkosyl). Incuber les puits pendant 3 à 5 min et récupérer l'échantillon des 3 puits (300 à 350 µl au total), et transférer dans un seul tube.
- v) L'ARN est alors précipité en ajoutant un mélange de 750 µl d'éthanol absolu et de 35 µl d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) ; les tubes sont agités sur vortex et incubés à -20 °C pendant au moins 1 h (une précipitation plus longue à -20 °C pendant une nuit peut aussi convenir).
- vi) Centrifuger les échantillons à 13 000 tr/min pendant 30 min à 4 °C ; le culot, visible après centrifugation, est lavé avec 500 µl d'éthanol à 70° froid (centrifugé à 13 000 tr/min pendant 10 min à 4 °C) et séché.
- vii) Préparer le mélange réactif pour la transcription réverse de l'ARN du virus de la MV. Le mélange réactif (volume total de 20 µl) contient : 4 µl de tampon de réaction AMV 5× (la concentration finale pour la réaction est de 8 mM MgCl₂, 30mM KCl, 1 mM de dithiothréitol, 50 mM de Tris/HCl, pH 8,5), 2 µl de mélange de 10 mM dNTP, 1 µl d'amorce Random Primer pd(N)₆ (100 pmol), 0,3 µl d'inhibiteur d'ARNase (12 unités), 0,2 µl de la transcriptase réverse AMV (5 unités) 0,5 µl de BSA (0,5µg) et 12 µl d'eau sans nucléase.
- viii) Remettre le culot d'ARN en suspension dans 20 µl de mélange pour transcription réverse (voir ci-dessus).
- ix) Incuber les réactions à 42 °C pendant 60 min puis pendant 3 min à 95 °C.
- x) PCR pour le génome viral de la MV : ajouter 5 µl de l'ADNc préparé à 20 µl du mélange d'amplification contenant 0,55 µl de KCl (2M) (la concentration finale est de 44 mM), 2 µl de mélange dNTP (10 mM), 1 µl de l'amorce pSVDV-SA2 (10 pmol : 5'-TCA-CGT-TTG-TCC-AGG-TTA-CC-3'), 1 µl de l'amorce pSVDV-SS4 (10 pmol : 5'-TTC-AGA-ATG-ATT-GCA-TAT-GGG-G-3'), 0,25 µl de la Taq polymérase (1,24 unités) et 15,2 µl d'eau sans nucléase.
- xi) Placer les plaques dans le thermocycleur et appliquer le programme suivant :
Un cycle à 94 °C pendant 3 min,
40 cycles à 94 °C pendant 20 s, 60 °C pendant 20 s, 72 °C pendant 30 s,
Un cycle à 75 °C pendant 5 min.
- xii) Mélanger une partie aliquote de 20 µl de chaque échantillon avec 4 µl de la solution de coloration et placer sur un gel d'agarose à 2 %. Après électrophorèse, un résultat positif se traduit dans le gel par un fragment de 154 pb du gène de l'ARN polymérase (3D).

Une analyse comparative des séquences du génome viral est utile pour établir des relations entre les isolats de virus de la MV par la détermination de la séquence nucléotidique d'une partie du génome. Grâce au séquençage d'environ 200 nucléotides liés au gène 1D codant la protéine structurale principale VP1, les souches de virus de la MV ont pu être classées selon leur homologie séquentielle. Il a aussi été possible de

lier d'un point de vue épidémiologique des souches isolées dans des régions et à des époques différentes (2). Une base de données des séquences des gènes du virus de la MV est disponible au Laboratoire de référence de l'OIE à Pirbright (Royaume-Uni).

2. Épreuves sérologiques

Les épreuves sérologiques sont utilisées au laboratoire pour confirmer des foyers, pour la surveillance sérologique et pour la certification en vue d'exportation. Souvent, la MV est uniquement diagnostiquée sur la base de tests sérologiques. Du fait du caractère subclinique ou bénin de la maladie, elle est souvent suspectée pour la première fois à l'occasion d'analyses sérologiques de routine pour une surveillance sanitaire ou pour un certificat d'exportation. Les tests de séroneutralisation virale (SN), d'immunodiffusion double, d'immunodiffusion radiale, de contre-immunoélectrophorèse, et l'ELISA, ont été décrits pour la détection d'anticorps dirigés contre le virus de la MV (1, 5, 8). Cependant, les épreuves les plus fréquemment employées sont la SN et le test ELISA. La SN est l'épreuve de référence officielle, mais elle présente deux inconvénients : elle requiert l'équipement nécessaire aux cultures cellulaires, et il faut 2 ou 3 jours pour la mettre en oeuvre. L'ELISA est plus rapide et plus facile à normaliser. Une petite proportion de sérums d'animaux n'ayant pas été exposés au virus de la MV réagit positivement dans les épreuves sérologiques pour les anticorps contre le virus de la MV. L'ELISA compétitif (MAC-ELISA) utilisant l'AcM 5B7 est le plus fiable pour la détection des anticorps (1, 9) mais des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres ELISA (4, 11). Les résultats obtenus sur une faible proportion, 0,25 % à 0,45 %, des sérums de porcs sains sont limites ou positifs avec les MAC-ELISA et doivent être testés à nouveau, cette fois en utilisant la SN. Jusqu'à 50 % environ de ces sérums seront également positifs avec la SN (i.e. 0,1 % à 0,2 % de la population initiale). Les animaux positifs en ELISA mais négatifs en SN peuvent être considérés comme non infectés. Des échantillons répétés doivent être collectés sur les animaux positifs dans chaque épreuve et sur la cohorte. Un titre constant ou déclinant chez un animal positif et l'absence d'anticorps contre le virus de la MV dans la cohorte confirme le statut de l'animal positif comme un « cas unique ». Les facteurs responsables de ces « cas uniques » restent inconnus. Une réaction sérologique croisée avec le virus de la MV peut survenir lors d'une infection avec un autre picornavirus, jusqu'alors non identifié, ou peut être due à d'autres facteurs non spécifiques présents dans le sérum. L'identification de l'isotype de l'anticorps présent dans le sérum positif (1) peut être utile dans la mesure où les sérums de porcs infectés contiennent uniquement des IgG spécifiques ou à la fois des IgG et IgM, tandis que les sérums de « cas uniques » contiennent, en général, uniquement des IgM et ne développent pas d'IgG (6). Des ELISA spécifiques des isotypes IgM/IgG sont utiles pour estimer la date à laquelle un porc ou un élevage a été infecté. La présence d'IgM, seule ou avec les IgG, est la preuve d'une infection récente et le signe d'une circulation du virus. Au contraire, la présence d'IgG seul suggère plutôt une vieille exposition à l'infection (1).

a) Séroneutralisation virale (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

La microépreuve de SN quantitative pour la détection d'anticorps contre le virus MV est réalisée en utilisant les cellules IB-RS-2 (ou des cellules porcines sensibles appropriées) en microplaques de culture cellulaire à fond plat.

Le virus est cultivé sur des monocouches de cellules et conservé à -20°C après addition d'un volume égal de glycérol. Le virus de MV est stable dans ces conditions pendant au moins 1 an. Le sérum est inactivé à 56°C pendant 30 min avant d'être utilisé dans l'épreuve. Le milieu adapté est le milieu complet de Eagle's/LYH avec des antibiotiques.

L'épreuve est un volume test égal dans un volume de 50 μl :

- i) En commençant à une dilution de 1/4, les sérums sont dilués sur la plaque en une série de dilution de 2 en 2, 2 rangées de puits par sérum ;
- ii) Un virus précédemment titré est ajouté ; chaque 50 μl d'unité de volume de suspension virale contient environ 100 DICT₅₀ (50 % de dose infectante de culture cellulaire) ;
- iii) Les témoins comprennent au moins un sérum faiblement positif et un sérum négatif, un témoin cellulaire et un titrage du virus pour calculer le titre du virus utilisé dans l'épreuve ;
- iv) Incuber à 37°C pendant 1 h en recouvrant les plaques ;
- v) Une suspension cellulaire à 10^6 cellules/ml est préparée dans un milieu contenant 10 % de sérum bovin pour la croissance cellulaire. 50 μl de suspension cellulaire est ajoutée à chaque puits ;
- vi) Les plaques sont fermées hermétiquement avec un adhésif sensible à la pression et incubées à 37°C pendant 2 à 3 jours. De manière alternative, les plaques peuvent être couvertes avec les couvercles non hermétiques et incubés à 37°C , en atmosphère à 5 % de CO_2 pendant 2 à 3 jours ;
- vii) Les lectures au microscope sont effectuées après 48 à 72 h ; les plaques peuvent être finalement fixées et marquées en routine au 3^e jour. La fixation est effectuée avec 10 % de formol salin pendant 30 min ;

le marquage est effectué par immersion dans 0,05 % de bleu de méthylène et 10 % de formol pendant 30 min. Les plaques sont rincés à l'eau du robinet ;

- viii) Les résultats positifs sont des plages de cellules colorées en bleu; les puits négatifs sont vides. Les titres sont exprimés comme la dilution finale de sérum présent dans le mélange virus-sérum au point 50 %. L'épreuve est considérée comme valide lorsque le titre de virus utilisé par puits est compris entre $10^{1,5}$ et $10^{2,5}$ DICT₅₀, et lorsque les sérum positifs de référence sont compris dans la valeur double de leur titre attendu ;
- ix) *Interprétation des résultats* : à Pirbright, au Laboratoire de référence pour la fièvre aphteuse de l'OIE (voir note de bas de page n°1), les titres de SN inférieurs ou égaux à 1/11 sont considérés comme négatifs. Les titres de 1/16 à 1/32 sont douteux et les titres de 1/45 ou plus sont positifs. Cependant, dans la mesure où les titres dépendent du système de culture cellulaire utilisé, les laboratoires doivent mettre en place leurs propres critères de référence pour normaliser les réactifs disponibles au Laboratoire de référence pour la fièvre aphteuse de l'OIE.

b) Méthode immuno-enzymatique

Le test ELISA développé par Brocchi *et al.* (1) consiste à piéger, en phase solide, l'antigène viral MV par l'AcM 5B7. On évalue ensuite la capacité des sérums analysés à inhiber la liaison de l'AcM 5B7 conjugué à la peroxydase avec l'antigène piégé. La quantité d'AcM conjugué lié est déterminée par addition de substrat et de chromogène.

- i) Les puits des plaques de microtitrage ELISA sont tapissés avec 50 µl d'AcM 5B7 dilué à saturation dans du tampon carbonate/bicarbonate, avec un pH de 9,6. Les plaques sont incubées à 4 °C pendant une nuit ;
- ii) Les plaques sont lavées 3 fois avec du tampon PBS contenant 0,05 % de Tween 20. On ajoute à chaque puits 50 µl d'antigène MV (virus de la MV multiplié sur cellules IB-RS-2, décanté, filtré et inactivé) dont la dilution optimale est déterminée au préalable. La dilution optimale de l'antigène est déterminée par titrage en échiquier de l'antigène et de l'AcM conjugué qui définit la dilution de travail en lui donnant une absorption de valeur comprise dans la partie supérieure de la région linéaire de la courbe de titration de l'antigène (entre 1,5 et 2 unités de densité optique). Les plaques sont ensuite placées en incubation pendant 1 h à 37 °C ;
- iii) Après avoir effectué 3 lavages supplémentaires, 50 µl des sérums testés dilués (non-inactivés) et de sérums témoins sont incubés avec l'antigène piège pendant 1 h, à 37 °C. On obtient directement des séries de sérums dilués de trois en trois dans les puits, en ajoutant 10 µl de sérum à 65 µl de tampon (dilution 1/7,5) et en transférant ensuite 25 µl de ce mélange aux puits suivants contenant 50 µl de tampon, et en éliminant finalement 25 µl ;
- iv) Après l'incubation de 1 h, on ajoute dans chaque puits, 25 µl de la dilution optimale de l'AcM 5B7 conjugué à de la peroxydase (voir ii, ci-dessus). Les plaques sont incubées à 37 °C pendant 1 h de plus ;
- v) Après une dernière série de lavages, on lance la réaction colorimétrique en ajoutant dans chaque puits 50 µl de solution substrat (par ex., 0,5 mg/ml d'orthophénylène-diamine [OPD] en tampon phosphate-citrate pH 5, contenant 0,02 % de H₂O₂) ;
- vi) On arrête la réaction au bout de 10 min, par addition de 50 µl de H₂SO₄ 2 N. La lecture de l'absorption s'effectue à une longueur d'onde appropriée à l'aide d'un lecteur de plaques.

On dilue l'antigène, les sérums, et le conjugué dans du tampon PBS, pH 7,4, contenant 0,05 % de tween 20 et 1 % d'extrait de levure. Le tampon de dilution des sérums contient, en plus, 1,0 % de sérum de souris afin d'éviter toute liaison non-spécifique entre les sérums de porc et l'AcM 5B7 présent sur les plaques ou conjugué à la peroxydase.

- vii) *Contrôles* : Sur chaque plaque, 4 puits contenant tous les réactifs, à part le sérum testé, confirment la valeur maximale de l'absorption pour l'antigène ; le sérum de porc convalescent à 4 dilutions déterminées ; le sérum de porc négatif ; le sérum de porc faiblement positif de référence ;
- viii) *Interprétation des résultats* : Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de chaque sérum analysé de la réaction entre l'AcM et les antigènes MV. Les sérums sont considérés comme positifs quand ils entraînent une inhibition ≥ 80 % à la dilution 1/7,5 ; comme négatifs quand l'inhibition est < 70 % à la dilution de 1/7,5 ; comme douteux quand l'inhibition est ≥ 70 % et < 80 % à la dilution de 1/7,5. La deuxième dilution (1/22,5) donne des informations sur le niveau en anticorps : les sérums fortement positifs entraînent une inhibition > 80 % aux deux dilutions (1/7,5 et 1/22,5), tandis que les sérums avec une inhibition > 80 % à la dilution de 1/7,5 mais avec une inhibition < 50 % à la dilution de 1/22,5 sont considérés comme faiblement positifs ou limite. Tous les sérums positifs limite ou douteux doivent être confirmés en utilisant la SN.

SÉRUMS ÉTALONS DE RÉFÉRENCE POUR LES SÉROLOGIES DE LA MV

Le Laboratoire référence de l'OIE, Pirbright, Royaume-Uni, maintient un ensemble de sérums de référence qui ont été largement validés par les laboratoires nationaux de référence des États Membres de l'Union Européenne pour la MV.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Aucun vaccin MV commercial n'est actuellement disponible. On peut se procurer des sérums étalons de référence auprès du Laboratoire de référence de l'OIE/FAO pour la fièvre aphteuse (voir note de bas de page n°1), et l'AcM 5B7 auprès du Laboratoire de référence de l'OIE pour la maladie vésiculeuse du porc en Italie (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BROCCHI E., BERLINZANI A., GAMBA D. & DE SIMONE F. (1995). Development of two novel monoclonal antibody-based ELISAs for the detection of antibodies and the identification of swine isotypes against swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods*, **52**, 155–167.
2. BROCCHI E., ZHANG G., KNOWLES N.J., WILSDEN G., MCCAWLEY J.W., MARQUARDT O., OHLINGER V.F. & DE SIMONE F. (1997). Molecular epidemiology of recent outbreaks of swine vesicular disease: two genetically and antigenically distinct variants in Europe, 1987–1994. *Epidemiol. Infect.*, **118**, 51–61.
3. CALLENS M. & DE CLERCQ K. (1999). Highly sensitive detection of swine vesicular disease virus based on a single tube RT-PCR system and DIG-ELISA detection. *J. Virol. Methods*, **77**, 87–99.
4. CHENARD G., BLOEMRAAD M., KRAMPS J.A., TERPSTRA C. & DEKKER A. (1998). Validation of a monoclonal antibody-based ELISA to detect antibodies directed against swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods*, **75**, 105–112.
5. DONALDSON A.I., FERRIS N.P., KNOWLES N.J. & BARNETT I.T.R. (1983). Comparative studies of United Kingdom isolates of swine vesicular disease virus. *Res. Vet. Sci.*, **35**, 295–300.
6. DE CLERCQ K. (1998). Reduction of singleton reactors against swine vesicular disease virus by a combination of virus neutralisation test, monoclonal antibody-based competitive ELISA and isotype specific ELISA. *J. Virol. Methods*, **70**, 7–18.
7. FALLACARA F., PACCIARINI M., BUGNETTI M., BERLINZANI A. & BROCCHI E. (2000). Detection of swine vesicular disease virus in faeces samples by immune-PCR assay. In: *Veterinary Virology in the New Millennium, Proceedings of the 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology*, Brescia, Italy, 27–30 August 2000, pp 173–174.
8. GOLDING S.M., HEDGER R.S., TALBOT P. & WATSON J. (1976). Radial immunodiffusion and serum neutralisation techniques for the assay of antibodies to swine vesicular disease. *Res. Vet. Sci.*, **20**, 142–147.
9. HECKERT A., BROCCHI E., BERLINZANI A. & MACKAY D. (1998). An international comparative analysis of a competitive ELISA for the detection of antibodies to swine vesicular disease virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 295–297.
10. 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.
11. KO Y.-J., CHOI K.-S., NAH J.-J., PATON D.J., OEM J.-K., WILSDEN G., KANG S.-Y., JO N.-I., KIM J.-H., LEE H.-W. & PARK J.-M. (2005). Noninfectious virus-like particle antigen for detection of swine vesicular disease virus antibodies in pigs by enzyme linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 922–929.
12. LIN F., MACKAY D.K.J. & KNOWLES N.J. (1997). Detection of swine vesicular disease virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **65**, 111–121.

13. LOXAM J.R. & HEDGER R.S. (1983). Swine vesicular disease: clinical signs, diagnosis, epidemiology and control. *Rec. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **2**, 11–24.
14. MANN J.A. (1981). Swine vesicular disease. *In: Virus Diseases of Farm Animals*, Vol. 2, Gibbs E.P.J., ed. Academic Press, London, UK, 365–381.
15. NUNEZ J.I., BLANCO E., HERNANDEZ T., GOMEX-TEJEDOR C., MARTIN M.I., DOPAZO J. & SOBRINO F. (1998). A RT-PCR assay for the differential diagnosis of vesicular viral diseases of swine. *J. Virol. Methods*, **72**, 227–235.
16. REID S.M., FERRIS N.P., HUTCHINGS G.H., KING D.P. & ALEXANDERSEN S. (2004). Evaluation of real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for the detection of swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods*, **116**, 169–176.
17. REID S.M., PATON D.J., WILSDEN G., HUTCHINGS G.H., KING D.P., FERRIS N.P. & ALEXANDERSEN S. (2004). Use of automated real-time RT-PCR to monitor experimental swine vesicular disease virus infection in pigs. *J. Comp. Pathol.*, **131**, 308–317.
18. VANGRYSPEERE W. & DE CLERCQ K. (1996). Rapid and sensitive polymerase chain reaction based on detection and typing of foot-and-mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. *Arch. Virol.*, **141**, 331–344.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de références de l'OIE pour la Maladie vésiculeuse du porc (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).

ENCÉPHALOMYÉLITE À TESCHOVIRUS

(anciennement encéphalomyélite à entérovirus ou maladie de Teschen/Talfan)

RÉSUMÉ

L'encéphalomyélite à Teschovirus, anciennement dénommée maladie de Teschen/Talfan (ou encéphalomyélite à entérovirus) a été d'abord décrite comme une encéphalomyélite du porc particulièrement virulente à issue souvent fatale. L'agent étiologique est un Teschovirus porcin de sérotype 1 (PTV-1 pour Porcine Teschovirus-1) du genre Teschovirus de la famille des Picornaviridae. Des formes moins sévères de la maladie ont été décrites tout d'abord au Royaume-Uni, où elle est connue sous le nom de « maladie de Talfan » ou sur le continent européen sous celui de « Poliomyelitis suum » ou parésie enzootique bénigne. En plus des souches virales de type PTV-1, des formes plus atténuées de la maladie sont associées à d'autres sérotypes de PTV, comme les PTV-2, -3, -4, -5, -6, -9 et 10.

La maladie a été décrite pour la première fois à Teschen en Tchécoslovaquie en 1929. Dans les années 1940 et 1950, elle a été à l'origine de pertes sévères en Europe, et s'est étendue aux autres continents. La forme clinique est devenue rare à l'heure actuelle et n'a pas été signalée en Europe de l'Ouest depuis 1980. Cependant, des enquêtes sérologiques indiquent que des variants de virus peu ou pas pathogènes circulent toujours parmi les populations porcines.

Identification de l'agent pathogène : *le virus présente une affinité pour le système nerveux central, par conséquent des broyats de cerveau ou de moelle épinière sont utilisés comme inoculum pour l'isolement viral. Le virus se cultive sur tapis cellulaire en monocouche d'origine porcine, notamment à partir de tissu rénal. L'effet cytopathogène (ECP) du PEV est caractérisé par la présence de cellules arrondies et réfringentes. L'identification du PEV et des différents sérotypes est basée sur l'utilisation de sérums spécifiques ou d'anticorps monoclonaux préparés contre les différentes souches de référence de PTV. Les tests de neutralisation virale ou de détection par immunofluorescence indirecte sont les plus indiquées. Une réaction d'amplification en chaîne par polymérase ciblant une partie du génome viral existe mais, à ce jour, aucun test spécifique n'a été formellement accepté pour le diagnostic.*

Épreuves sérologiques : *en raison de la prévalence sérologique vis-à-vis du PTV-1 qui peut dépasser 60 % dans des populations de porcs sains en Europe centrale et de la présence de signes cliniques similaires dus à d'autres virus, incluant d'autres sérotypes de PTV, une simple recherche d'anticorps positive ne permet pas de conclure que les signes neurobiologiques observés sont vraiment dus à une infection par le PTV-1. Pour considérer le virus PTV-1 comme l'agent infectieux responsable de la maladie clinique, il faut avoir une augmentation de l'ordre de 4 fois du titre en anticorps, associée aux signes typiques. La séroneutralisation virale (SN) en microplaques ou la méthode immuno-enzymatique (ELISA) sont les épreuves de détection d'anticorps recommandées pour la réalisation d'enquêtes sérologiques spécifiques du PTV-1 au sein de populations porcines.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *quand la maladie clinique était fréquente, des vaccins étaient utilisés. Maintenant que les cas de maladie sont rares, il n'existe plus de vaccins disponibles.*

A. INTRODUCTION

L'encéphalomyélite à *Teschovirus* (anciennement maladie de Teschen/Talfan puis, ensuite, encéphalomyélite à entérovirus) présente une forme aiguë chez le porc caractérisée par des désordres du système nerveux central (SNC). Teschen est le nom de la ville de la République Tchéque où la maladie a été décrite pour la première fois en 1929 (4, 5). Dans les années 1950, la maladie a diffusé à travers l'Europe et a causé d'énormes pertes à l'élevage porcin. Des formes moins sévères, d'expression enzootique bénigne, ont été reconnues tout d'abord au Royaume-Uni sous le nom de maladie de Talfan et au Danemark, sous celui de « *Poliomyelitis suum* ». L'encéphalomyélite à *Teschovirus* n'a pas été signalée en Europe occidentale depuis 1980 (en Autriche) et elle est considérée comme rare à l'heure actuelle. Au cours des douze dernières années (depuis 1996) la maladie n'a été rapportée à l'OIE que par les pays suivants : Belarus (1996, 1999 et 2005), Japon (2002), Lettonie (1997 et 2000–2002), Madagascar (1996–2000, 2002 and 2004–2005), Moldavie (2002–2004), Roumanie (2002), Russie (2004), Ouganda (2001) et Ukraine (1996–2005). Dans la plupart des cas, il n'est pas possible de savoir si le diagnostic a été porté sur la base des seuls signes cliniques ou s'il y a eu confirmation par le laboratoire, excepté au Japon en 2002 (17).

L'agent causal de l'encéphalomyélite à teschovirus est le teschovirus porcin de sérotype 1 (PTV-1 pour *Porcine Teschovirus*-1) qui appartient à l'espèce *Teschovirus* porcin, du genre *Teschovirus*, de la famille des *Picornaviridae* (2, 5). Auparavant, les PTV étaient classés parmi les *Enterovirus* et les 11 sérotypes des entérovirus porcins, PEV-1 à PEV-11, étaient regroupés en 3 groupes – I, II et III – sur la base de l'effet cytopathogène (ECP) observé, de leur culture sur des types cellulaires différents, et des réactions sérologiques (7). Le groupe I est composé des sérotypes PEV-1 à PEV-7 et PEV-11 à PEV-13. Sur la base des séquences nucléotidiques et des analyses phylogénétiques, les virus du groupe I des PEV sont maintenant classés parmi les *Teschovirus*. Les PEV-1 à PEV-7 ont été renommés PTV-1 à PTV-7 et les PEV-11 à 13 ont été renommés PTV-8 à PTV-10 ; un sérotype supplémentaire, PTV-11, a été décrit récemment (8, 14). Le groupe II contient le PEV-8 (espèce *Porcine enterovirus A*) et le groupe III, les sérotypes PEV-9 et -10 (espèce *Porcine enterovirus B*). Ces deux derniers groupes appartiennent au genre *Enterovirus* (14, 18) bien qu'il ait été suggéré de reclasser le PEV-8 dans un nouveau genre de picornavirus (8).

Les PTV-2, -3, -4, -5, -6, -9 et -10 ont été isolés de porcs présentant des formes atténuées de la maladie (16). Les infections dues aux PTV sont souvent asymptomatiques. Les sérotypes peuvent être différenciés en utilisant un test de séroneutralisation virale (SN) (2, 7), un test de fixation du complément (6) ou par immunofluorescence indirecte (IFI) (1, 13).

Les infections à PTV se développent uniquement chez les suidés ; les autres espèces animales ne sont pas connues comme étant sensibles.

Le diagnostic différentiel doit être fait avec la maladie d'Aujeszky (pseudo-rage) et la peste porcine classique (forme aiguë). En outre, l'encéphalite japonaise, l'infection à *Streptococcus suis* et les encéphalomyélites à virus hémagglutinants peuvent à l'occasion entraîner des symptômes similaires. Des étiologies non infectieuses, notamment des intoxications, peuvent aussi être prises en considération.

Les PTV peuvent être identifiés par la sérologie et des sérums spécifiques de référence ont été préparés par hyperimmunisation de cobayes, lapins, ou de porcelets indemnes d'immunité maternelle (privés de colostrum) avec des souches de référence des sérotypes de PTV-1 à 11.

Le porc s'infecte par voie oronasale. La période d'incubation est d'environ 14 jours. Les principaux signes de l'état prodromique sont de l'hyperthermie jusqu'à 41,5 °C, de la lassitude, de l'anorexie et des problèmes locomoteurs. Cette étape est suivie par une hypersensibilité, des tremblements, des spasmes des membres, une paralysie flaque, de l'opisthotonos et du nystagmus. Des convulsions peuvent être observées chez les jeunes cochons. En phase clinique terminale, il est observé de la paralysie démarrant de la zone lombaire et évoluant progressivement vers la partie antérieure du sujet. La paralysie du centre de thermorégulation provoque une hypothermie. Quand les muscles respiratoires sont paralysés, l'animal meurt de suffocation.

Le diagnostic de laboratoire est basé sur la présence de signes cliniques typiques associés à des lésions histologiques du cerveau et de la moelle épinière, ainsi que sur l'identification du virus à partir du SNC des porcs affectés et la détection d'anticorps spécifiques dans le sang des animaux convalescents.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Examen histologique et immunohistochimie

Pour un diagnostic histologique, des échantillons de cerveau, cervelet, diencephale, bulbe rachidien et de la moelle épinière cervicale ou lombaire sont prélevés. Les échantillons sont fixés au formol et les coupes réalisées sont colorées selon les méthodes histologiques conventionnelles. Le virus se multiplie dans le SNC en provoquant une polio-encéphalomyélite non suppurative avec une infiltration périvasculaire de lymphocytes, en particulier au niveau de la moelle épinière (4). Des modifications pathologiques sont observées dans la matière grise du diencephale, du cervelet, du bulbe rachidien et des cornes ventrales de la moelle épinière (notamment, de façon constante, les ganglions des racines des nerfs dorsaux et trijumeaux [ganglioneurites]), et dans une moindre mesure des hémisphères cérébraux. Chez les très jeunes animaux, les lésions peuvent toucher aussi les cornes dorsales de la moelle épinière. La dégénérescence des neurones (épaississement, chromatolyse, nécrose, neurophagie et dégénérescence axonale) et leur remplacement par microgliose (astrobytose, astrogliose) sont observés pendant la phase terminale de la maladie.

La détection des antigènes des teschovirus par immunohistochimie sur coupe de prélèvements de SNC fixés est très délicate et n'est pas toujours possible. Si des anticorps spécifiques ou des anticorps monoclonaux sont disponibles, ainsi que les techniques de détection appropriées, une corrélation entre les modifications pathologiques observées et la localisation de l'agent est possible sur des coupes paraffinées de prélèvements de SNC fixés.

2. Identification de l'agent pathogène

a) Isolement viral

Les progrès dans le diagnostic de l'encéphalomyélite à teschovirus et dans la production de vaccins ont été rendus possible par la multiplication du virus sur culture cellulaire (9, 11).

Des échantillons de cerveau et de moelle épinière sont récoltés à partir de porcs abattus au stade précoce de la maladie. Si les échantillons ne sont pas traités immédiatement, ils sont conservés dans une solution tamponnée faite à parts égales de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) de pH 7,4 et de glycérol. Des morceaux de tissu sont broyés pour préparer une suspension à 10 % (poids/vol) dans du PBS. La suspension est centrifugée à 800 *g* pendant 10 min. et le liquide surnageant est utilisé pour l'inoculation des cultures cellulaires. Des cellules de première explantation de rein de porc en monocouche ou des lignées cellulaires établies d'origine porcine sont utilisables pour l'isolement viral des PTV.

- **Protocole**

- i) Un tapis cellulaire quasi confluent (monocouche) est utilisé en tube ou en flacons de culture cellulaire. Le milieu de culture est éliminé et les tubes ou flacons sont inoculés avec 0,1 ml du broyat tissulaire suspect.
- ii) Les tubes ou les microplaques inoculés sont incubés pendant 1 h à 37 °C sous agitation douce (tubes roulants ou balancelle).
- iii) L'inoculum est éliminé, et les tubes ou flacons de culture cellulaire sont rincés avec du PBS avant de les remplir avec 1 à 20 ml (selon le type de flacon de culture cellulaire utilisé) de milieu de survie sans sérum de veau.
- iv) Les tubes ou microplaques sont examinés au microscope chaque jour. Si l'échantillon contient du PTV, un ECP caractéristique est visible après 3 à 4 jours. L'ECP est caractérisé par de petits foyers de cellules rondes et réfringentes. Après plusieurs passages, le virus se multiplie mieux et génère des ECP complets dès 24 h. L'identification du PTV peut être confirmée par utilisation de sérum spécifique ou d'anticorps monoclonaux. La SN ou l'IFI sont les tests les mieux adaptés à cette fin. Quand, par identification sérologique, l'isolat a été confirmé être du PTV, l'inoculation à des porcelets est le seul moyen certain d'en vérifier la pathogénicité.

b) Le test de séroneutralisation virale pour l'identification du teschovirus porcin

Le virus récolté à partir de culture cellulaire est dilué dans le milieu de survie selon un pas de dilution de dix de 10^{-1} à 10^{-6} . Pour sérotyper le teschovirus, 12 rangées de chaque dilution sont préparées ; 50 µl de sérum spécifique de référence anti-PTV-1 à 11 dilué au 1/10 sont ajoutés aux rangées 1 à 11 et 50 µl de sérum négatif sont ajoutés dans la dernière rangée. Ces mélanges sont incubés pendant une nuit à 4 °C ou 1 h à 37 °C, puis inoculés sur un tapis cellulaire confluent dans des tubes de culture ou dans des puits de microplaques. Les cultures cellulaires inoculées sont incubées à 37 °C. La présence d'un ECP est recherchée après 72 h et chaque jour suivant jusqu'au 10^e jour, selon le jour où l'ECP apparaît.

L'identification d'un sérotype de PTV est confirmée si le titre viral observé en présence de cet antisérum est au moins 10^3 fois plus faible que le celui obtenu en présence de sérum négatif.

c) L'épreuve d'immunofluorescence indirecte pour la confirmation de la présence d'antigène de teschovirus porcin sur cellules

L'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) est basée sur la reconnaissance des antigènes présents dans des cellules infectées par des anticorps spécifiques d'un sérum positif (13). Grâce à l'utilisation d'antiglobulines conjuguées à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), la réaction est visualisée en microscopie à UV ou utilisant une source lumineuse bleue. Les antigènes sont détectables dans les cellules dès 12 h après l'infection par le PTV, c'est-à-dire avant le début de l'ECP. Les sérums polyclonaux montrent souvent des réactions croisées entre les différents types de PTV, qui peuvent conduire à des erreurs d'interprétation.

- **Protocole**

- i) Le matériel suspect est inoculé sur une lamelle recouverte d'un tapis de cellules rénales porcines. Il est recommandé d'introduire et de traiter des témoins positif et négatif en parallèle des échantillons à tester.
- ii) Après une incubation de 12 à 16 h, les lamelles sont lavées 2 fois au PBS, séchées à l'air puis fixées avec de l'acétone froid pendant 5 à 15 min.
- iii) Les lamelles sont placées dans une boîte humide et recouvertes avec du sérum de porc ou de lapin anti-PTV préalablement dilué au 1/10 dans du PBS ou avec un anticorps monoclonal spécifique à sa dilution de travail.
- iv) La boîte humide est fermée et mise à incuber à 37 °C pendant 60 min.
- v) Les lamelles sont ensuite retirées et lavées 3 fois avec du PBS, puis recouvertes avec un sérum de chèvre anti-lapin ou anti-porc conjugué FITC, à une dilution déterminée au préalable, puis incubées à 37 °C pendant 30 min.
- vi) Les lames sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS, séchées à l'air et montées dans du tampon Tris 0,1 M - glycérol, pH 8,6.

Après ce traitement, les lamelles sont observées au microscope. Les lamelles témoins sont examinées en premier pour valider la spécificité de la fluorescence observée. La fluorescence est de couleur vert pomme et apparaît dans le cytoplasme et à la périphérie du noyau. À la place de lamelles, on peut aussi utiliser des inserts pour chambre de culture cellulaire multipuits, ou des microplaques.

d) La technique de la transcription inverse couplée à une amplification en chaîne par polymérase

La transcription inverse couplée à une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) permet la détection et la différenciation de régions spécifiques du génome des teschovirus porcins (12, 19). La RT-PCR nichée utilisant des sondes spécifiques est utilisée pour différencier les virus entre les PTV et les PEV (19). La PCR est plus rapide et moins laborieuse que l'isolement viral sur culture cellulaire et l'identification du virus par sérotypage. Toutefois la PCR est actuellement encore réservée à des laboratoires spécialisés.

3. Épreuves sérologiques

Comme la séroprévalence du PTV-1 peut dépasser 60 % dans des populations porcines saines de certains pays d'Europe centrale, et que les mêmes symptômes peuvent être dus à d'autres virus dont certains autres sérotypes de PTV, un résultat positif à une simple analyse sérologique pour le PTV-1 ne confirme pas que les signes nerveux observés sont réellement dus au PTV-1. La possibilité d'une infection à PTV-1 peut être prise en considération pour expliquer une expression clinique de la maladie seulement si en plus des signes typiques, on observe une augmentation de 4 fois le titre en anticorps spécifiques. L'existence de réactions croisées avec d'autres teschovirus orphelins est une des raisons pour laquelle l'analyse des sérums deux par deux est nécessaire pour confirmer la signification des titres en anticorps.

Les porcs qui ont guéri de la maladie ou ceux qui ne l'ont pas exprimée produisent des anticorps spécifiques. Des méthodes sérologiques sont disponibles pour leur détection, dont la SN en microplaque utilisant des cultures cellulaires de rein de porc qui est la plus utile (10). Une épreuve immuno-enzymatique (ELISA) a aussi été développée qui est plus sensible et plus rapide (3).

Pour la mise en œuvre du diagnostic sérologique, il est indispensable de disposer des souches de référence des différents sérotypes de PTV cultivées sur cellules et de sérum hyperimmun monospécifique de ces types de PTV.

- **Souches de référence de teschovirus porcins**

Caractéristiques : basée sur une longue expérience, la souche « Zabreh », isolée en Tchécoslovaquie au moment du pic d'incidence de la maladie, a été sélectionnée comme souche de référence pour générer une forme sévère d'encéphalomyélite à teschovirus. Le pouvoir pathogène de la souche est maintenu par passage intracérébral sur des porcelets privés de colostrum. Le virus génère des signes typiques d'encéphalomyélite à teschovirus après une période d'incubation de 5 à 7 jours. Pour le diagnostic sérologique, les souches de sérotypes de PTV à utiliser sont pour le type 1 : Talfan, pour le type 2 : T80, pour le type 3 : O2b, pour le type 4 : PS36, pour le type 5 : F26, pour le type 6 : PS37, pour le type 7 : F43, pour le type 8 : V13, pour le type 9 : Ger-2899/84, pour le type 10 : Ger-460/88, pour le type 11 : Dresden.

Stock viral : les souches de référence sont multipliées sur culture de cellules de première explantation de rein de porc ou sur lignée cellulaire établie, par exemple des PK-15. Une suspension à 10 % dans du PBS, pH 7,4, est préparée à partir du cerveau ou de la moelle épinière de porcelets infectés expérimentalement avec du PTV. Certains types sont isolés à partir des fèces. La suspension est centrifugée et le surnageant est utilisé pour inoculer les cultures. Le protocole de multiplication du PTV sur culture cellulaire est décrit ci-après :

Le milieu de culture est éliminé et après rinçage au PBS, les cellules sont inoculées avec la suspension virale à 37 °C. Le volume de l'inoculum est environ 10 % du volume usuel de milieu de culture. Après 1 h d'incubation à 37 °C, l'inoculum est éliminé, le flacon de culture est rincé avec le PBS et le tapis cellulaire est recouvert du volume approprié de milieu sans sérum mais supplémenté en antibiotiques. L'ECP se développe dans les 48 h, et le tapis cellulaire se désintègre plus ou moins complètement pendant les 48 à 72 h suivantes. Après 3 à 5 passages consécutifs en culture cellulaire, le développement de l'ECP s'accélère et la concentration en virions augmente. Le titrage viral est réalisé dans des tubes de culture ou en microplaques. Une souche adaptée en culture cellulaire peut atteindre un titre de 10^6 – 10^7 DICT₅₀/ml (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire).

Le surnageant récolté est vérifié pour sa spécificité en utilisant des sérums hyperimmuns spécifiques connus. Un traitement avec 5 % de chloroforme ou un essai de culture sur cellules humaines, bovines ou d'embryons de poulet sont utilisés pour exclure une contamination par d'autres virus. Le PTV est résistant au chloroforme et se multiplie uniquement sur des cellules d'origine porcine. Une révélation par immunofluorescence est utile pour détecter de possibles contaminants qui sont résistants au chloroforme et qui se multiplient aussi sur cellules d'origine porcine (ex : le parvovirus), ou qui sont non-cytopathogènes. Le stock viral est distribué en petites fractions aliquotes qui sont conservées à une température inférieure à –60 °C. Le virus congelé conserve ses propriétés pendant plusieurs années. Pour une utilisation en neutralisation virale, une dose de virus constante de 100 DICT₅₀ est recommandée.

- **Sérum hyperimmun spécifique**

Un sérum hyperimmun spécifique est obtenu par immunisation répétée de cobayes, lapins ou porcelets privés de colostrum avec du PTV. Même si les animaux proviennent d'élevages exempts d'organismes pathogènes spécifiques, ils sont tout de même testés avant immunisation pour vérifier l'absence d'anticorps anti-PTV. Des souches de référence sont utilisées de préférence. Les lapins sont immunisés par administration intraveineuse de la suspension virale seule, ou par voies sous-cutanée ou intrapéritonéale en utilisant une suspension virale avec 10 % d'adjuvant huileux. De bons résultats peuvent être obtenus par administration de 3 doses de 2 ml de suspension virale + 0,2 ml d'adjuvant huileux à intervalle de 2 semaines. Les lapins sont saignés 10 jours après la dernière immunisation. Les porcelets sont immunisés de la même manière. Les sérums sont clarifiés par centrifugation et conservés en petites fractions aliquotes à –20 °C. Les sérums sont titrés par neutralisation virale en présence d'une dose constante de virus. Seuls les sérums dont le titre est supérieur au 1/256 peuvent être utilisés pour l'identification du virus.

a) Le test de séroneutralisation virale en microplaques

Le test est réalisé sur des microplaques de culture cellulaire à fond plat, en utilisant des cellules de première explantation de rein de porc d'un passage peu élevé, ou des lignées cellulaires d'origine porcine. Le stock viral est multiplié sur tapis cellulaire. Le virus récupéré à partir de cultures cellulaires est clarifié par centrifugation et conservé en fractions aliquotes à –20 °C. Le milieu de culture, comme du milieu complet de Eagle ou LYH (solution saline tamponnée de Hanks avec une solution d'extrait de levure, de lactalbumine et d'antibiotiques), est utilisé comme diluant. Le virus récolté des cultures cellulaires est clarifié par centrifugation et conservé en parties aliquotes à –70 °C, ou sous forme d'un mélange 50/50 avec du glycérol qui peut être conservé à –20 °C.

- **Protocole**

- i) Inactiver le sérum par la chaleur pendant 30 min à 56 °C.

- ii) Les sérums à tester sont dilués dans du milieu de culture cellulaire selon un pas de dilution de raison deux du 1/2 au 1/64, à raison de 4 puits par dilution et de 50 µl de volume par puits.
- iii) Les témoins incluent des sérums témoins positif et négatif, des contrôles cellulaires et de milieu.
- iv) Ajouter à chaque puits 50 µl de la dose à l'emploi, préalablement diluée dans du milieu de culture pour obtenir 100 DICT₅₀.
- v) Incuber pendant 1 h à 37 °C avec les plaques recouvertes. Le virus résiduel est incubé de la même manière.
- vi) Réaliser un titrage de la dose d'emploi selon un pas de dilution de raison dix en utilisant 50 µl par puits et 4 puits par dilution.
- vii) Ajouter 50 µl de suspension cellulaire de rein de porc à 5×10^5 cellules par ml.
- viii) Après agitation, les plaques sont recouvertes et mise à incuber à 37 °C sous une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 2 à 3 jours ou plus, jusqu'à un maximum de 8 jours.
- ix) Les plaques sont examinées au microscope pour rechercher l'ECP. Le test est validé par vérification du titrage de la dose à l'emploi et du titre du sérum témoin positif. Le titre du virus est de 100 DICT₅₀ avec une variation tolérable entre 30 et 300. Le titre du sérum témoin positif peut varier de 0,3 log₁₀ unités autour du titre moyen prédéterminé. Le sérum témoin négatif ne doit pas neutraliser le virus à sa plus faible dilution, ex : au 1/2.
- x) Le titre neutralisant est déterminé selon la méthode de Spearman-Kärber, comme étant la dilution du sérum qui neutralise le virus dans 50 % des puits.
- xi) Les titres en neutralisation virale sont considérés comme positifs si le sérum neutralise le virus à la dilution initiale supérieure au 1/8.

b) Épreuve immuno-enzymatique

La technique ELISA est une méthode alternative de détection des anticorps contre le PTV (3). Le test est réalisé en microplaques en utilisant du PTV cultivé sur cellules comme antigène. La technique peut être mise en œuvre en appliquant les étapes suivantes.

- **Préparation de l'antigène**

- i) Le stock de virus est préparé en culture cellulaire soit sur cellules de première explantation de rein ou de testicule de porc, soit sur lignée cellulaire établie comme, par exemple les cellules PK-15. Le milieu de croissance est retiré et après rinçage avec du tampon, les cellules sont inoculées avec la suspension virale à un faible taux de multiplicité d'infection. Après 30 min d'incubation à 37 °C, les cellules sont recouvertes d'un volume approprié de milieu sans sérum mais avec antibiotiques. L'incubation se poursuit à 37 °C avec observation quotidienne au microscope. L'ECP doit apparaître en 48 h et le tapis cellulaire doit être plus ou moins détruit au cours des 48-72 h suivantes. Une souche adaptée à la culture cellulaire peut donner des titres de 10⁶ à 10⁷ DICT₅₀ par ml.
- ii) Le virus récupéré est clarifié par centrifugation à 200 **g** pendant 15 min, puis précipité avec une solution saturée à 50 % de (NH₄)₂SO₄ pendant 120 min à 4 °C.
- iii) Après centrifugation à 2 000 **g**, le précipité récupéré est resuspendu dans du tampon TEN (Tris-hydroxyméthyl-méthylamine [0,01 M], éthylène diamine tétra-acétate [1 mM] et NaCl [0,15 M]), pH 7,4, au 1/100 du volume initial.
- iv) La suspension virale concentrée est extraite par agitation avec du fréon 3/1 pendant 10 min à 4 °C.
- v) Après une autre centrifugation, le surnageant est divisé en deux phases séparées. La phase aqueuse supérieure contenant l'antigène viral est dessalée par passage sur colonne en Sephadex G 25 de 2,5 × 40 cm.
- vi) La solution virale est finalement concentrée par ultracentrifugation à 160 000 **g** pendant 3 h.
- vii) Le culot est repris dans du tampon TEN, pH 7,4, sous un volume d'environ le millième du volume initial du virus.
- viii) Les protéines insolubles sont séparées par centrifugation douce et le surnageant est utilisé comme antigène positif en ELISA.

- **Protocole**

- les plaques sont sensibilisées en ajoutant 100 µl à chaque puits de l'antigène prédilué dans du PBS, pH 7,2. L'adsorption de l'antigène à la surface de la plaque se fait sur une nuit à 4 °C. Des rangées parallèles de la plaque sont sensibilisées avec de l'antigène négatif.
- La plaque est lavée 5 fois avec du PBS pour éliminer l'excès d'antigène.
- Les sérums à tester sont dilués au 1/20 dans du PBST (solution physiologique tamponnée au phosphate contenant 0,05 % de Tween 20). Chaque sérum dilué est déposé en 4 exemplaires à raison de 50 µl par puits : deux avec de l'antigène positif et deux pour l'antigène négatif (l'antigène négatif est préparé comme décrit ci dessus à l'exception que le tapis cellulaire n'est pas inoculé avec du virus et que les cellules sont éclatées par congélation). La plaque est incubée pendant 1 h à 37 °C.
- Les plaques sont lavées 5 fois avec du PBST.
- 50 µl d'une dilution préalablement déterminée de sérum de lapin anti-immunoglobulines de porcs conjugué à la peroxydase de raifort, sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont à nouveau incubées pendant 1 h à température ambiante.
- Les plaques sont lavées 5 fois au PBS.
- 100 µl de la solution du substrat (0,1 % orthophenyl-endiamine et 0,03 % de peroxyde d'hydrogène dans du PBS, pH 6,0) sont ajoutés à chaque puits.
- Après l'ajout de substrat, les échantillons positifs changent de couleur et deviennent marron foncé. Quand la réaction colorée est suffisamment développée dans les puits contenant les sérums témoin positif, la réaction est arrêtée en ajoutant 50 µl d'acide sulfurique 2 M à chaque puits. L'absorbance dans les puits est mesurée à la longueur d'ondes de 492 nm, en utilisant de préférence un spectrophotomètre à multicanaux avec un système d'impression. Les sérums témoin positif et négatif et le témoin cellules non infectées sont traités de la même manière que les échantillons à tester.
- Le calcul de l'absorbance d'un sérum prend en compte la valeur moyenne des 2 puits avec antigène positif à laquelle est soustraite la valeur moyenne des 2 puits avec antigène négatif. Pour qu'un sérum soit considéré comme positif, la valeur calculée de l'absorbance doit excéder au moins de 2 fois la moyenne obtenue pour le sérum témoin négatif.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

- **Vaccins anti-encéphalomyélite à teschovirus**

Lors de la période d'incidence la plus élevée en Europe et à Madagascar, une immunoprophylaxie active a été menée pour contrôler l'infection (15). Depuis que les formes cliniques sévères ont disparu, la vaccination est arrêtée et le vaccin n'est plus utilisé ni produit nulle part dans le monde.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AUERBACH J., PRAGER D., NEUHAUS S., LOSS U. & WITTE K.H. (1994). Grouping of porcine enteroviruses by indirect immunofluorescence and description of new serotypes. *J. Vet. Med. [B]*, **41**, 277–282.
- BETTS A.O. (1960). Studies on enteroviruses of the pig. VI. The relationship of the T 80 strain of a swine polioencephalomyelitis virus to some other viruses as shown by neutralization tests in tissue cultures. *Res. Vet. Sci.*, **1**, 296–300.
- HUBSCHLE O.J.B., RAJOANARISON J., KOKO M., RAKOTONDRAMARY E. & RASOLFOMANANA P. (1983). ELISA for detection of Teschen virus antibodies in swine serum samples. *Dtsch Tierarztl. Wochenschr.*, **90**, 86–88.
- KLOBOUK A. (1931). Encephalomyelitis enzootica suum. *Zverolekarsky obzor*, **24**, 436–480.
- KLOBOUK A. (1933). Aetiology of the so-called Teschen disease – Encephalomyelitis enzootica suum. *Zverolekarske rozpravy*, **8**, 85–96.

6. KNOWLES N.J. & BUCKLEY L.S. (1980). Differentiation of porcine enterovirus serotypes by complement fixation. *Res. Vet. Sci.*, **29**, 113–115.
7. KNOWLES N.J., BUCKLEY L.S. & PEREIRA H.G. (1979). Classification of porcine enteroviruses by antigenic analysis and cytopathic effects in tissue culture: description of 3 new serotypes. *Arch. Virol.*, **62**, 201–208.
8. KRUMBHOLZ A., DAUBER M., HENKE A., BIRCH-HIRSCHFELD E., KNOWLES N.J., STELZNER A. & ZELL R. (2002). Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups. *J. Virol.*, **76**, 5813–5821.
9. MADR V. (1959). Propagation of the Teschen disease virus in cell cultures. *Veterinarstvi*, **IX**, 298–301.
10. MAYR A. & BIBRACK B. (1971). Demonstration of Teschen Talfan infection using a micromodification of neutralization test. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **18**, 657–664.
11. MAYR A. & SCHWOEBEL W. (1957). Propagation of the Teschen disease virus in porcine kidney cell cultures and properties of the cultured virus. 1.2.3. part. *Zentralbl. Bakteriол. [I. Orig.]*, **168**, 329–359.
12. PALMQUIST J., MUNIR S., TAKU A., KAPUR V. & GOYAL S.M. (2002). Detection of porcine teschovirus and enterovirus type II by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **14**, 476–480.
13. ROMANENKO V.F., PRUSS O.G., BELYI YU.A. & KUPNOVSKAYA L.V. (1982). Immunofluorescent diagnosis of porcine encephalomyelitis. *Veterinariia*, **4**, 69–72.
14. STANWAY G., BROWN F., CHRISTIAN P., HOVI T., HYYPIÄ T., KING A.M.Q., KNOWLES N.J., LEMON S.M., MINOR P.D., PALLANSCH M.A., PALMENBERG A.C. & SKERN T. (2005). Family *Picornaviridae*. In: Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Elsevier/Academic Press, London, UK, 757–778.
15. TRAUB E. (1942). Active immunization against Teschen disease using vaccines adsorbed on aluminium hydroxide. *Arch. Tierheilkd*, **77**, 52–66.
16. WITTE VON K.H., AUERBACH J., LOSS K.U., NEUHAUS S. & PRAGER D. (1994). Typisierung von 17 porzinen Enterovirusisolationen aus Polioenzephalomyelitisfällen der Jahre 1983–1991. *DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, **101**, 453–492.
17. YAMADA M., KOZAKURA R., Ikegami R., NAKAMURA K., KAKU Y., YOSHII M. & HARITANI M. (2004). Enterovirus encephalomyelitis in pigs in Japan caused by porcine teschovirus. *Vet. Rec.*, **155**, 304–306.
18. ZELL R., DAUBER M., KRUMBHOLZ A., HENKE A., BIRCH-HIRSCHFELD E., STELZNER A., PRAGER D. & WURM R. (2001). Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. *J. Virol.*, **75**, 1620–1631.
19. ZELL R., KRUMBHOLZ A., HENKE A., BIRCH-HIRSCHFELD E., STELZNER A., DOHERTY M., HOEY E., DAUBER M., PRAGER D. & WURM R. (2000). Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differentiation of CPE groups I–III with specific primer sets. *J. Virol. Methods*, **88**, 205–218.

*
* *

GASTROENTÉRITE TRANSMISSIBLE

RÉSUMÉ

La gastroentérite transmissible (GET) est une maladie entérique des porcs provoquée par le virus de la GET (VGET), appartenant à la famille des Coronaviridae. Depuis 1984, un variant respiratoire distinct (le coronavirus respiratoire porcin ou CVRP) a émergé dans beaucoup de régions du monde. Ce virus est probablement un mutant de délétion du VGET. Le CVRP ne semble pas être un agent pathogène primaire important, mais il participe au complexe des maladies respiratoires du porc et a considérablement compliqué le diagnostic de la GET, en particulier le diagnostic sérologique.

Le diagnostic de laboratoire est réalisé en démontrant la présence du virus, des antigènes viraux ou de l'acide nucléique viral dans des prélèvements issus de cas suspectés, ou par détection des anticorps spécifiques.

Identification de l'agent pathogène : *le virus peut être identifié par isolement en culture de cellules, microscopie électronique, différentes épreuves immunologiques, et plus récemment par détection spécifique de l'ARN viral. Les épreuves rapides les plus généralement utilisées sont probablement les épreuves immunologiques, en particulier la méthode immuno-enzymatique (ELISA) sur fèces et les épreuves d'immunofluorescence sur des coupes d'intestin. Une autre maladie entérique, la diarrhée épidémique porcine, est provoquée par un coronavirus sérologiquement différent du VGET, mais qui montre une morphologie identique au microscope électronique. L'immunomicroscopie électronique permet de différencier ces virus.*

Épreuves sérologiques : *les méthodes les plus largement répandues sont la séroneutralisation et les tests ELISA. Seuls ces derniers permettent la différenciation avec le CVRP, car les anticorps dirigés contre le VGET et le CVRP montrent une réaction croisée totale en neutralisation.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *il n'y a aucun produit biologique commercial disponible sur le marché international. Cependant, plusieurs pays pratiquent la vaccination, et aux États-Unis d'Amérique, des autorisations de mise sur le marché ont été accordées pour des vaccins mono- et multivalents.*

A. INTRODUCTION

La gastroentérite transmissible (GET) est une maladie entérique des porcs provoquée par le virus de la GET (VGET), un membre de la famille des *Coronaviridae*. Depuis 1984, un variant respiratoire distinct (le coronavirus respiratoire porcin ou CVRP) a émergé dans beaucoup de régions du monde et est maintenant détecté dans la plupart des pays où des études ont été menées, exception faite de l'Océanie. Les foyers de GET sont devenus plus sporadiques. La maladie est toujours signalée de façon occasionnelle en Europe, en Amérique du nord et en Asie (31). Le VGET se multiplie au niveau des entérocytes et les détruits, érodant l'intestin grêle, produisant une atrophie des villosités et une entérite. La diarrhée et le vomissement sont présents chez les porcs de tous les âges ; la mortalité est la plus élevée chez les nouveau-nés. Les sites de multiplication extra-intestinaux incluent le tractus respiratoire supérieur et les tissus mammaires (20), mais le virus est plus facilement isolé de l'intestin et des fèces. En revanche, le CVRP est plus facilement isolé du tractus respiratoire supérieur, de la trachée, des amygdales ou des poumons ; la multiplication entérique du virus est faible, voire absente (10, 32, 39), bien que le CVRP puisse être détecté par une réaction de transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase nichée (RT-PCR) dans les écouvillons nasaux et les fèces de porcs infectés (9). Le CVRP est probablement un mutant de délétion de VGET (41), comme cela est confirmé par des données récentes comparant les séquences du génome complet de 30 kb du VGET et du CVRP (66).

La GET est une maladie contagieuse qui peut produire une épizootie explosive. Les méthodes de diagnostic rapide de confirmation sont très importantes. La maladie peut également prendre la forme d'un problème enzootique, de diarrhée post-sevrage circulant à bas bruit, ce qui est plus difficile à diagnostiquer. De même, une infection par le VGET qui survient dans un troupeau immunisé vis-à-vis du CVRP provoque des cas sporadiques plus bénins ce qui, dans ces cas, complique encore plus le diagnostic de la GET (22).

L'existence de réservoirs du VGET chez les animaux sauvages ou domestiques a été soupçonnée. Des carnivores domestiques ou sauvages (renards, chiens, voire visons) et les chats présentent des anticorps anti-VGET, ce qui suggère qu'ils pourraient être des porteurs asymptomatiques potentiels du virus et joueraient le rôle de réservoirs entre les épizooties saisonnières (hiver). Cependant l'infection des porcs n'a été confirmée que par des chiens infectés en série par le VGET et excréant le virus (46). Sur la base des similitudes génétiques et antigéniques, il a été proposé de considérer le VGET, le CVRP et les coronavirus félins et canins comme des descendants d'un coronavirus ancestral ayant muté dans son spectre d'hôtes. Des oiseaux sauvages (*Sturnus vulgaris*) et des mouches (*Musca domestica*) qui excrètent le VGET pendant respectivement 32 h et 72 h ont été proposés comme vecteurs mécaniques (46).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Le virus peut être identifié par isolement en culture de cellules (12), immunofluorescence, inhibition de l'hémagglutination, technique immuno-enzymatique (ELISA), radioimmunoessais (RIA), hybridation avec des sondes d'ADN, microscopie électronique, et, plus récemment, par détection spécifique de l'ARN viral (14, 21, 37, 46, 55, 64). Les techniques moléculaires développées ces dernières années, telles que la technique de transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) et la RT-PCR nichée, ont augmenté la sensibilité et la spécificité de la détection et de la différenciation du VGET avec le CVRP, directement à partir d'échantillons de terrain (9, 21, 22, 37). Une méthode de diagnostic alternative, qui a été recommandée pour des laboratoires ne possédant pas l'équipement pour les essais spécialisés, est l'infection par voie orale de porcelets sensibles et n'ayant pas d'anticorps anti-VGET ou anti-CVRP avec du contenu intestinal suspect. Cependant, des essais en laboratoire sont encore exigés pour confirmer la sensibilité des porcs avant l'inoculation et pour prouver que la maladie induite chez ces animaux est due à la GET. Les épreuves rapides les plus fréquemment utilisées sont probablement les immunodiagnostic, en particulier les tests ELISA sur les fèces (4, 25, 62) l'immunofluorescence (IF) sur des coupes d'intestin au cryostat (40), et l'immunohistochimie (IHC) sur des coupes formolées et fixées dans la paraffine (53). La détection du virus par inhibition de l'hémagglutination a également été décrite (1). Une autre maladie entérique, la diarrhée épidémique porcine (DEP), est provoquée par un coronavirus sérologiquement distinct qui, néanmoins, a un aspect identique en microscopie électronique. Par immuno-microscopie électronique, il est possible de différencier les deux infections (44, 61) comme cela se fait avec les épreuves de détection du virus de DEP (23).

a) Isolement de virus en culture de cellules

Indépendamment de l'inoculation des porcelets (12), l'isolement du virus en culture de cellules est la méthode de diagnostic de certitude. Cependant, pour une utilisation courante, elle est lente et laborieuse. Le VGET ne se multiplie pas très bien en culture de cellules, rendant cette technique impraticable comme procédure de diagnostic de routine. En outre, l'isolement du VGET à partir de porcs issus de troupeaux séropositifs vis-à-vis du CVRP pose problème et exige de placer des porcs séronégatifs vis-à-vis du VGET et du CVRP au sein des troupeaux suspects pour servir d'animaux sentinelles, à partir desquels les échantillons sont prélevés en vue de l'isolement ou la détection du VGET (9, 22). Le CVRP peut être isolé par culture tissulaire en utilisant des cellules et des techniques similaires à celles qui sont utilisées pour l'isolement du VGET, toutefois les échantillons suivants sont dans ce cas les plus optimaux : cellules ou fluides des muqueuses nasales, tissus de la trachée, des amygdales ou des poumons ou encore homogénats (9, 39).

L'isolement viral pour le VGET est habituellement effectué ante-mortem à partir des fèces ou *post mortem* à partir de l'intestin grêle. Des anses de l'intestin grêle, ligaturées à chaque extrémité pour maintenir le contenu ou des empreintes de la muqueuse intestinale sont les prélèvements de choix. Le virus est sensible à la chaleur, tous les échantillons devraient donc être frais ou maintenus au froid.

L'échantillon est homogénéisé dans du milieu de culture cellulaire ou dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,2 ; contenant des antibiotiques, par exemple de la pénicilline (1 000 U/ml), de la dihydrostreptomycine (1 000 µg/ml), et de la mycostatine (20 U/ml), pour obtenir une suspension à 10 %. Cette suspension peut rester 30 min à température ambiante hors de la lumière directe du soleil. La suspension est alors soniquée et clarifiée par centrifugation à vitesse réduite. Le surnageant

peut être mélangé à un volume égal de sérum bovin, inactivé par la chaleur, afin de réduire l'effet cytotoxique du matériel. Cette suspension est alors employée pour inoculer les cultures de cellules sensibles, telles que les monocouches de cellules de première ou seconde explantation de reins de porc de 3 à 4 jours. D'autres cultures cellulaires porcines (telles que thyroïde ou testicule) de faible nombre de passages et quelques lignées de cellules (17, 27) peuvent également être employées pour l'isolement primaire du virus. Après incubation à 37 °C pendant 1 h, les couches de cellules sont recouvertes avec du milieu, tel que le « Earle's yeast lactalbumine » (EYL), solution salée équilibrée, contenant du bicarbonate de sodium et des antibiotiques, par exemple de la pénicilline (100 U/ml), de la dihydrostreptomycine (100 µg/ml), de la mycostatine (20 U/ml), et 1 % de sérum foetal de veau. L'incorporation de trypsine dans le milieu de culture peut augmenter la production virale primaire (5, 17). Des cultures témoins non-inoculées sont réalisées parallèlement et toutes les cultures sont incubées à 37 °C.

On peut observer l'effet cytopathogène viral (ECP) après 3 à 7 jours, caractérisé par des cellules s'arrondissant, s'agrandissant, formant des syncytia et se détachant du support. La formation de plages est parfois plus fiable et plus facile à reconnaître. Un recouvrement approprié est obtenu par l'utilisation d'agar noble à 1,6 % dans du milieu minimum essentiel concentré 2x avec 1 % NaCO₃, des antibiotiques (voir ci-dessus), 0,7 % de rouge neutre et 1 % de DEAE (diéthylaminoéthyl) (100 µg/ml). Le type sauvage du VGET ne se développe pas aisément en culture de cellules, ainsi plusieurs passages peuvent-ils être nécessaires avant que des changements distinctifs ne deviennent évidents. Des isolats cytopathogènes doivent être confirmés comme étant du VGET par immunomarquage ou par séroneutralisation *in vitro* en utilisant des antisérums spécifiques du VGET appropriés (5). Si les anticorps monoclonaux (AcM) appropriés sont disponibles, ils peuvent être employés pour distinguer le VGET du CVRP par immunomarquage (15, 54). La différenciation entre le VGET et le CVRP peut également se faire par l'utilisation de sondes d'ADN spécifiques du VGET (2) ou par RT-PCR discriminatoire ou RT-PCR nichée (9, 21, 22, 37).

b) Recherche des antigènes viraux par immunofluorescence

L'immunofluorescence est un moyen rapide, sensible et spécifique pour identifier les antigènes viraux de la GET dans des coupes d'intestin au cryostat. Il est nécessaire que le porc soit mort récemment, et idéalement âgé de moins de 4 semaines (de préférence moins de 1 semaine) et qu'il soit au début de l'expression des signes cliniques (c'est-à-dire, dans un délai de 24 à 28 h post-infection). Dans les 30 min suivant la mort, des coupes de 2 cm de long provenant de 4 régions différentes de la partie postérieure de l'intestin grêle devraient être prélevées. Des coupes de 5 à 10 mm de long sont congelées dans la carboglace. L'orientation correcte du matériel est importante pour s'assurer que le découpage par le cryostat corresponde à de véritables sections transversales. Les coupes font 6 µm d'épaisseur, sont montées sur des lamelles, séchées à l'air et fixées à l'acétone. Une technique alternative plus rapide consiste à prélever et à découper longitudinalement une petite fraction de la partie distale du petit intestin, de la laver soigneusement avec du PBS, et de préparer des empreintes de la muqueuse intestinale sur des lames lavées à l'alcool puis de les faire sécher à l'air et de les fixer à l'acétone (5). Les lames sont ensuite traitées et colorées comme décrit ci-après. Des coupes ou des empreintes témoins positives et négatives sont stockées à -20 °C et analysées en parallèle aux échantillons. Après lavage avec le tampon Tris, pH 8,7, ou le PBS, les coupes sont marquées avec une solution diluée d'anticorps conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) spécifiques du VGET, et placées dans un incubateur humide à 37 °C pendant 30 min. Les anticorps non liés sont éliminés par lavage avec du tampon Tris. Il est possible de faire une contre-coloration des coupes avec une dilution 10⁻⁵ de bleu d'Evans dans le tampon Tris et de les monter dans du glycérol.

Les coupes ou empreintes marquées devraient être examinées aussitôt que possible par microscopie sous lumière ultraviolette. La qualité du marquage est évaluée en se référant aux témoins. Une interprétation précise dépend de la conservation de l'architecture des villosités, dont les cellules épithéliales sont examinées pour la fluorescence intra-cytoplasmique.

Une méthode utilisant la réaction peroxydase-antiperoxydase pour la démonstration du VGET a été développée récemment pour la détection du VGET et du CVRP à la fois dans des tissus congelés, fixés au formol et les tissus paraffinés (19, 53). Cette technique appliquée aux tissus formolés présente deux avantages : elle peut être réalisée, préalablement ou rétrospectivement, sur les mêmes tissus formolés que ceux utilisés pour l'histologie, et les tissus ou les lames fixés sont facilement transportables car ils sont stables et ne contiennent pas de virus vivant (53).

c) Détection des antigènes viraux dans les matières fécales par ELISA

Un système en sandwich peut être employé, par exemple avec une capture des antigènes par des AcMs et des Anticorps polyclonaux détecteurs liés à l'enzyme (25, 48). Cet essai est basé sur la capture de l'antigène viral dans l'échantillon fécal par 3 AcMs, 2 spécifiques de la protéine de S (sites A et D) et 1 de la nucléoprotéine N (25, 48). Un puit contenant des Ac purifiés, provenant de liquide d'ascite de souris

inoculées avec des cellules de myélome SP2/0, qui ne reconnaissent pas le VGET, est employé comme témoin négatif, pour valider la spécificité de l'essai. Les AcMs sont déposés dans une plaque 96 puits, dans une solution tampon de bicarbonate, pH 9,6, et incubés la nuit à 37 °C. Tous les échantillons sont testés en double, un sur le «coating» positif (AcM du VGET) et l'autre sur le «coating» négatif. Les échantillons fécaux sont dilués dans le milieu de culture de cellules (1/10), vortexés et centrifugés à vitesse réduite (2 000 g) pendant 15 min. Le surnageant est décanté dans des tubes stériles et testé ou conservé congelé. Les plaques sont lavées 2 fois avec le tampon de lavage (PBS contenant 0,05 % Tween 20) avant d'ajouter les échantillons fécaux préparés. Les plaques sont incubées la nuit à 37 °C. Après 4 lavages, un sérum polyclonal biotinylé anti-VGET est ajouté dans le tampon PBS contenant 0,05 % de Tween 20. Les plaques sont incubées 1 h à 37 °C. Ensuite, elles sont lavées 4 fois avant d'ajouter un conjugué marqué à la peroxydase streptavidine et incubées 1 h à 37 °C. Les plaques sont lavées 6 fois avant d'ajouter le substrat de l'enzyme, l'ABTS (acide 2,2'-azino-di-[3-ethyl-benzthiazoline]-6-sulfonique) avec 0,03 % d'H₂O₂ dans la solution tampon de citrate 0,1 M, pH 4,2. La réaction est arrêtée après 30 min à température ambiante par l'addition du sulfate dodécylique de sodium 5 % et l'absorbance est déterminée dans un lecteur d'ELISA à 405 nm. Des échantillons fécaux négatifs et positifs du VGET sont inclus dans chaque plaque.

d) Méthodes de détection de l'acide nucléique viral

L'hybridation *in situ* (HIS) et les méthodes de RT-PCR ont été décrites pour la détection directe du VGET dans les échantillons cliniques, avec différenciation du CVRP (21, 37, 55). Une seconde PCR, nichée, peut augmenter de manière significative la sensibilité de la méthode (9, 21, 22, 36). La différenciation entre les virus de GET peut être réalisée en analysant des produits de PCR avec des enzymes de restriction (64) ou par séquençage (9, 22, 28, 38, 66). Une RT-PCR duplex pour la détection combinée de VGET et de virus de la diarrhée épidémique porcine a été décrite (23).

2. Épreuves sérologiques

La sérologie a valeur de diagnostic si une augmentation du titre en anticorps peut être démontrée. En outre, un résultat séropositif simple peut avoir valeur de diagnostic s'il est issu d'une population précédemment connue pour être séronégative. Une épreuve sérologique avant importation et le fait de n'accepter que des animaux séronégatifs dans une exploitation sont des conditions qui réduisent l'apparition d'animaux porteurs parmi les porcs.

Après l'infection avec le VGET ou le CVRP, des anticorps viraux peuvent être détectés dans le sérum 6 ou 7 jours post-infection, et de tels anticorps persistent au moins pendant plusieurs mois. Bien que les anticorps dirigés contre le CVRP et le VGET montrent la neutralisation complète de l'un ou l'autre virus, il y a des différences dans les spécificités de certains anticorps non neutralisants (7, 14, 15, 46, 54). En effet, le CVRP ne possède pas certains épitopes du VGET. La séroneutralisation n'est pas une méthode pratique pour différencier le CVRP du VGET. Des AcMs spécifiques à ces régions peuvent être incorporés dans des ELISA de compétition pour détecter les anticorps présents dans le sérum qui sont entièrement spécifiques du VGET. Tandis que de tels essais sont fiables du fait qu'ils ne produisent pas de résultats faux-positifs avec des antisérums de CVRP, des faux-négatifs peuvent se produire en raison d'une sensibilité réduite comparée aux essais de séroneutralisation, et en raison de la variation parmi les souches de VGET, telle qu'un AcM spécifique du VGET peut ne pas identifier toutes les souches (6, 54). Le problème du peu de sensibilité peut être réduit en employant les essais sur base d'un groupe ou d'un troupeau. Ces ELISA basés sur les AcMs sont la méthode de choix pour différencier CVRP du VGET lors de la qualification des animaux à l'exportation.

En outre, l'utilisation de tels essais pour le diagnostic différentiel en moins de 3 semaines après exposition au CVRP conduit à des résultats non fiables et non reproductibles (50). Des résultats plus précis ont été obtenus en examinant les échantillons de sérums couplés (phase aiguë et convalescence) et en employant la protéine recombinante S du VGET comme antigène fixé au support, au lieu des cellules testiculaires de porcs infectées par le VGET (50).

a) Épreuves pour les virus de la gastroentérite transmissible porcine / coronavirus respiratoire porcin

Ces épreuves détectent les anticorps dirigés contre le VGET et le CVRP. Elles incluent des tests de séroneutralisation, des ELISA indirects (16, 18, 26, 29, 42) et ELISA de compétition basé sur l'utilisation d'AcM spécifique de groupe VGET/CVRP (35).

Des tests de séroneutralisation peuvent être réalisés avec une variété de types cellulaires et de souches virales. Les lignées cellulaires généralement utilisées incluent les cellules de testicules de porcs (27) ou des cellules rénales porcines de première explantation ou continues. De tels tests ont été très largement utilisés pendant de nombreuses années et sont généralement considérés comme référence pour évaluer de nouvelles méthodes. Une épreuve de neutralisation par réduction de plaques, utilisant des cellules de testicule de porc dans des plaques à 6 puits et la souche Purdue du VGET atténué, est couramment utilisée (5). Une modification de la méthode de Witte (63), décrite ci-dessous, emploie des plaques de culture

cellulaire pour microtitrage à fond plat, une lignée de cellules A72 dérivées d'une tumeur rectale de chien, et une souche virale de terrain adaptée pour se multiplier sur ces cellules : 100 DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) de virus sont incubées avec les sérums inactivés à la chaleur. La neutralisation est indiquée par l'absence d'ECP après incubation avec les cellules A72 dans le milieu de Leibovitz 15 (Sigma, Royaume-Uni) avec antibiotiques, 10 % de sérum foetal de veau de et 1 % de L-glutamine. Le volume total de réactifs dans chaque puits devrait être de 150 µl.

- **Séroneutralisation : protocole**

- i) Les sérums sont inactivés pendant 30 minutes au bain-marie à 56 °C ;
- ii) Des dilutions de 2 en 2 des sérums à tester sont faites dans du milieu de culture de cellules, en commençant par le sérum non dilué (cela donne une étape de dilution de séroneutralisation de 1/2 une fois mélangé à un volume égal de suspension virale). Les dilutions sont préparées dans une plaque à fond plat de microtitrage de 96 puits en utilisant, de façon optimale, 3 puits par dilution et 25 µl par puits. Des sérums témoins positifs et négatifs sont également inclus dans l'épreuve. Aucun sérum de référence n'est disponible, mais il conviendrait de préparer des sérums internes positifs de référence possédant un titre situé dans une gamme appropriée ;
- iii) 25 µl du stock de VGET sont ajoutés dans chaque puits, à une dilution effectuée dans le milieu de culture et calculée pour fournir 100 DICT₅₀ par puits. Le virus devrait être ajouté à 2/3 des puits contenant le sérum, pour chaque dilution. Le troisième puits sert de témoin, contenant uniquement le sérum, et devrait recevoir 25 µl de milieu de culture au lieu du virus ;
- iv) Le virus restant est titré par 4 étapes de dilution en 10 fois en utilisant 25 µl par puits et au moins 4 puits par dilution ; 25 µl du milieu de culture sont ajoutés à chacun des puits pour compenser l'absence du sérum d'essai ;
- v) Les plaques sont agitées brièvement et incubées 1 h à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ ;
- vi) 100 µl, par exemple, de suspension de cellules A72 à 2×10^5 cellules/ml sont ajoutés à chaque puits ;
- vii) Les plaques sont incubées pendant 3 à 7 jours à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ ; l'épreuve peut être réalisée avec succès même si les plaques sont incubées sans CO₂ ;
- viii) Les plaques sont lues au microscope pour l'ECP. L'épreuve est validée en vérifiant le titre du virus (qui devrait avoir une valeur de 100 DICT₅₀ avec des valeurs tolérées entre 50 et 200 DICT₅₀) et les sérums témoins. Le sérum positif de référence devrait avoir une valeur divergeant au maximum de 0,3 log₁₀ de la valeur moyenne prédéterminée. Des lectures de chaque dilution de sérum testé devraient être faites en référence au puits ne contenant que du sérum témoin pour distinguer l'ECP viral d'un effet cytotoxique induit par le sérum ou par une contamination ;
- ix) Les résultats pour le sérum testé sont déterminés par la méthode de Spearman-Kärber comme la dilution de sérum qui a neutralisé le virus dans 50 % des puits ;
- x) Un sérum négatif ne devrait donner aucune neutralisation à la plus faible dilution testée (c'est-à-dire le sérum non dilué, équivalent à une dilution de 1/2 à l'étape de neutralisation).

b) Épreuves spécifiques au VGET pour différencier les porcs infectés par le VGET de ceux infectés par le CVRP

Les épreuves spécifiques du VGET sont des ELISA bloquant ou de compétition, qui emploient un AcM qui reconnaît le VGET mais pas le CVRP (6, 8, 50, 54, 60), et sont les épreuves de choix pour les animaux à l'exportation. Les sérums testés, provenant de porcs infectés antérieurement par une souche de VGET reconnue par cet AcM, contiendront des anticorps de la même spécificité, qui peuvent entrer en compétition avec lui, pour lier les antigènes du VGET fixés aux plaques ELISA. Les porcs infectés par le CVRP qui ne possède pas l'épitope unique du VGET ne produiront pas d'anticorps contre cet épitope ; les anticorps anti-CVRP n'entreront donc pas en compétition avec l'AcM spécifique anti-VGET ou ne bloqueront pas ses sites de liaison (6, 8, 50, 54, 60). Les antigènes de l'ELISA peuvent être préparés à partir de lysats de cellules rénales qui ont été, soit inoculées avec des souches virales du VGET adaptées à la culture de cellules, soit non infectées. Alternativement, des cellules de testicules de porcs infectées par le VGET ou non infectées, fixées à l'acétone à 80 %, sont employées comme source d'antigène. Les antigènes peuvent être également préparés à partir de la protéine recombinante S (rec-S) prélevée sous forme soluble dans une lignée de cellules d'insectes (Sf9) infectées par un baculovirus recombinant exprimant la protéine S du VGET, qui contient les 4 sites antigéniques majeurs (50, 54). Des antigènes positifs et négatifs sont fixés de manière à alterner les rangées sur la plaque de microtitrage, en utilisant une solution de tampon bicarbonate à pH 9,6. Les dilutions des sérums à tester, y compris des témoins positifs anti-VGET et négatifs anti-VGET et anti-CVRP, ainsi que des témoins positifs anti-CVRP (négatifs pour ce test mais positifs en neutralisation) sont ajoutées aux puits appropriés et incubées durant la nuit avant l'addition de l'AcM dilué dans tous les puits. Les AcMs attachés sont détectés par un anticorps anti-souris conjugué à la peroxydase, qui induit une coloration en présence d'un substrat approprié. Les changements de couleur sont mesurés en utilisant un

spectrophotomètre et, pour chaque échantillon testé, le résultat net est la différence d'absorbance entre les puits positifs et négatifs en antigène, exprimés comme un pourcentage du résultat obtenu avec le sérum témoin négatif. La valeur du bruit de fond pour l'épreuve doit être déterminée par une épreuve préalable sur des populations négatives et positives connues. Il existe plusieurs kits de diagnostic spécifiques du VGET disponibles dans le commerce.

Les épreuves basées sur l'hémagglutination décrites jusqu'à aujourd'hui (24, 30, 51) ont été validées avant l'apparition du CVRP. Cependant, elles sont spécifiques du VGET car le VGET est hémagglutinant, contrairement au CVRP (47).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

La vaccination contre la GET est utilisée dans plusieurs pays.

Des lignes directrices pour la fabrication des vaccins à usage vétérinaire sont données dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ci-dessous et dans le Chapitre 1.1.8. sont volontairement de nature générale et peuvent être complétées par des exigences nationales et régionales.

Les données sur le travail expérimental et sur les essais sur le terrain des vaccins contre le VGET ayant reçu une autorisation de mise sur le marché aux États-Unis d'Amérique (USA) ont été analysées, notamment les limitations probables quant à leur efficacité sur le terrain et les concepts relatifs à l'élaboration optimale d'un vaccin contre le VGET (43, 45, 46). Il existe plusieurs fabricants aux USA ayant une autorisation pour produire des vaccins contre le VGET qui comprennent des vaccins à virus vivants atténués et des vaccins à virus inactivés. Les vaccins à virus vivants atténués sont utilisés par voie orale chez les truies gestantes (afin d'induire une immunité passive). Ils ont également été autorisés pour une utilisation, également par voie orale, chez les cochons allaités ou sevrés (afin d'induire une immunité active). Les vaccins à virus inactivés sont autorisés pour une administration par voie parentérale : en intramusculaire chez les truies gestantes et en intrapéritonéale chez les cochons allaités ou sevrés. En règle générale, lors d'évaluations dans des conditions expérimentales contrôlées ou sur le terrain dans des élevages vaccinés contre le VGET et le CVRP, ces vaccins ont induit une protection passive marginale contre les épreuves au VGET chez les porcelets allaités. Bien qu'ils aient échoué à protéger efficacement contre une épizootie de GET, les données laissent penser que ces vaccins peuvent fournir une certaine efficacité lors d'enzootie de GET en stimulant une réponse anamnétique des anticorps présents dans le sérum et le lait (45, 46).

La raison principale proposée pour expliquer certains des échecs de vaccination contre le VGET est l'incapacité de stimuler des niveaux élevés en IgA sécrétées (SIgA) dans le lait, analogues aux anticorps SIgA trouvés dans le lait des truies naturellement infectées par le VGET (45, 46). En outre, ces vaccins ne protègent pas efficacement la truie sans anticorps contre la GET, et les conséquences souvent observées en cas de GET chez la truie sont : l'anorexie, l'agalaxie et l'échec de protection passive de leurs porcelets. Ainsi les vaccins à virus vivants atténués peuvent-ils ne pas se multiplier jusqu'au niveau exigé pour produire une immunité protectrice dans l'intestin, ou, il des risques de réversion de la virulence existent, s'ils sont donnés à des animaux séronégatifs en période néonatale. Les vaccins à virus inactivés administrés par voie parentérale n'induisent pas la production d'anticorps de type SIgA ; la réponse immunitaire à médiation cellulaire est souvent faible et la durée de l'immunité peut être de courte durée. Bien qu'on ait proposé l'utilisation du CVRP comme candidat vaccinal pour la GET, les études expérimentales concernant leur efficacité contre le VGET ont montré un manque d'efficacité totale (34) ou une protection croisée partielle (3, 11, 59). Cependant, la distribution étendue des infections par le CVRP dans la population de porcs en Europe semble avoir nettement réduit l'incidence de la GET épizootique en Europe (39). De plus, les nouvelles stratégies d'utilisation de l'ADN recombinant pour le développement des vaccins contre le VGET incluent l'utilisation possible d'un vaccin sous-unitaire contenant la protéine S (dépendant du développement de systèmes d'injection au niveau de la muqueuse et des adjuvants) (33, 49, 52) ou l'utilisation des vecteurs viraux recombinants ou de vecteurs bactériens exprimant des gènes de VGET importants pour l'induction de l'immunité (13, 43, 46, 56, 57, 65).

Il existe un certain nombre de conditions générales (par exemple la production dans un laboratoire autorisé, le respect des bonnes pratiques, des normes, etc.) s'appliquant à tous les produits biologiques comprenant les vaccins. Un ensemble de règlements existe (appelé « standard requirements », ou SRs) décrivant les tests à effectuer sur le vaccin et les matériaux d'origine. L'information détaillée sur les SRs pour des vaccins aux USA est contenue dans le « Code of federal regulations » (CFR), titre 9, volume 1, partie 113 (abrégée ci-dessous en tant que 9 CFR, 113) (58). Les règles générales de la monographie de la Pharmacopée Européenne et de l'EMA (*European Medicines Agency*) sont applicables aux vaccins contre la GET. Toutefois, aucun vaccin contre la GET n'est utilisé à l'heure actuelle dans l'Union Européenne.

1. Gestion de la semence virale

a) Caractéristiques de la semence virale

La semence virale doit être testée pour sa pureté et son identité. La pureté inclut l'absence de bactéries et de champignons (9 CFR 113:27), de mycoplasmes (9 CFR 113:28), et d'autres virus (9 CFR 113:55) (58). La démonstration de l'identité virale est habituellement réalisée par séroneutralisation ou immunofluorescence. Pour les vaccins produits par génie génétique ou issus de souches naturelles avec des gènes délétés ou inactivés, il faut fournir la preuve de cette identité (génotypique et/ou phénotypique).

b) Méthode de culture

La culture doit être effectuée sur les cellules prouvées non contaminées (certifiées), et le nombre de passages de cellules est limité (habituellement à 5). On n'exige pas que l'espèce d'origine des cellules soit celle de l'espèce cible du virus.

c) Validation du vaccin

La validation vaccinale prend deux formes. Le lot de semence primaire est considéré comme immunogène si un vaccin fait au passage le plus élevé, et selon les directives de production, s'avère protecteur. Le niveau antigénique le plus bas (titre en virus vaccinal vivant atténué ou masse d'antigène inactivé) qui s'avère protecteur devient le niveau seuil pour toutes les futures productions (lots) du produit. Dans le cas de produits vivants, les facteurs intervenants dans les variations éventuelles du titre et des courbes de décroissance au cours du temps devraient être ajoutés. Ces vaccins devraient être testés pour la pureté, l'innocuité, et l'efficacité par le fabricant. La protection doit être démontrée contre la maladie naturelle par épreuve virulente. L'inoculation utilise le virus virulent sauvage à une dose qui provoque la maladie chez au moins 95 % des animaux témoins sensibles à la maladie. Trois productions doivent être faites successivement et examinées par le fabricant et par l'autorité compétente, pour l'activité protectrice, la stérilité et l'innocuité avant l'autorisation de mise sur le marché.

2. Méthode de fabrication

Ces informations font partie de la propriété des fabricants et ne sont donc pas disponibles.

3. Contrôles en cours de fabrication

Il est en grande partie du ressort de la propriété industrielle. Quelques contrôles de procédure se réfèrent directement à la production (par exemple, la concentration en O₂ dans les fermenteurs). Une autre catégorie, cependant, inclut des tests semblables au test de l'activité du produit fini. Pour tous les vaccins, plus le test d'activité sur le lot final ou le récipient est simple, plus il est probable qu'il puisse être employé comme test de suivi/mélange : par exemple, le titre du virus mesuré sur les lots peut être employé pour prévoir le titre final du mélange de plusieurs lots. Les composants d'origine animale doivent être stérilisés ou être exempts de contamination.

4. Contrôles des lots

Des lots doivent être mélangés selon les caractéristiques finales et les spécifications de mise en flacons (par exemple, plusieurs lots de fermentation peuvent être mis en commun, ou un lot de fermentation peut être divisé et mis en commun avec d'autres, etc.). Dans certains pays, les contrôles du produit en vrac (bulk) et en cours de processus définissent le produit et sont le sujet d'une réglementation et d'un examen approfondis. Aux USA, l'accent est mis sur le produit final. Les techniques de contrôle de lot doivent être détaillées dans les directives de production et doivent être significatives, traçables, et le fabricant doit éliminer tout produit qui ne respecte pas les caractéristiques exigées. Si un lot doit être exporté vers un autre pays pour mélange ou mise en flacon, alors il est soumis à l'ensemble du test comme si c'était le produit final.

a) Stérilité

Tous les produits doivent être examinés pour leur stérilité. Le fabricant peut également exécuter des tests de stérilité sur des lots pour une surveillance en routine. Les tests sont semblables à ceux décrits dans la section C.1.a.

b) Innocuité

Des tests d'innocuité sont effectués avant d'accorder l'autorisation sur le produit fini (sections C.5.a et C.5.b).

c) Activité

L'activité doit seulement être testée si le test d'activité fait avant la mise en flacon (pour confirmer les calculs de mélanges) était un test simple (par exemple un ELISA).

d) Durée de l'immunité

La durée de l'immunité est mesurée lors des tests (efficacité) effectués avant l'autorisation de mise sur le marché, et non lors de la phase de contrôle du lot. Concernant les programmes de revaccination, des épreuves virulentes (efficacité) effectuées à des intervalles de temps spécifiés après la vaccination sont exigés pour tous les nouveaux vaccins.

e) Stabilité

La stabilité est établie avant que l'autorisation de mettre le lot sur le marché ne soit accordée. Le vieillissement accéléré à 37 °C est employé pour estimer la durée de vie du vaccin, de sorte que les produits puissent ne pas être maintenus à la température de stockage (4 °C) pour la période donnée en temps réel. Ceci sera confirmé plus tard par des données en temps réel. Le fabricant n'est pas tenu de faire les tests de stabilité. Les fabricants doivent donner la quantité de matériel antigénique qui se trouve dans leur produit durant toute la durée de conservation. Des échantillons de produit sont choisis (vaccin à virus vivant habituellement) et examinés dans les 30 jours de l'expiration pour voir si, par exemple, le titre est au niveau indiqué dans le cahier des charges du fabricant. La stabilité est également affectée par l'humidité. L'humidité résiduelle dans un produit déshydraté peut réduire le temps de conservation. Ceci doit donc être examiné dans le produit fini ou durant la procédure de fabrication.

f) Agents de conservation

Il existe des restrictions quant aux quantités maximums d'antibiotique qui peuvent être contenues dans un produit. Des restrictions à certains composants de vaccins sont liées à leur innocuité et au délai d'attente qui doit être assez long pour que le composant disparaisse avant que l'animal soit abattu. Les agents de conservation utilisés sont des molécules déposées et protégées.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Tous les risques dus au vaccin doivent être clairement énoncés sur la notice. Ceci s'applique habituellement aux avertissements en cas de gestation pour les virus vivants provoquant des avortements, et les risques de choc anaphylactiques, mais peut également avertir l'utilisateur quant à la douleur ou au gonflement éventuel au site d'injection, ou à la fièvre et à l'inappétence passagère dans certains cas. Il n'existe pas de précaution spéciale qui s'applique aux vaccins contre la GET actuellement autorisés.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Habituellement ce test sera réalisé sur une souris et/ou un cobaye ou un porc (9 CFR 113:33, et réf. 63). Des tests de stérilité sont également effectués sur le produit final.

b) Activité

Il n'y a aucun test d'activité avant mise sur le marché. Quel que soit le test employé, il doit être corrélé avec la protection chez l'animal hôte (tests d'efficacité). L'activité des vaccins à virus vivants contre le VGET peut être évaluée par titrage *in vitro* de la dose infectieuse virale en culture de cellules (43). Ce titre doit être corrélé avec le titre viral minimum exigé pour produire une immunité protectrice contre une épreuve virulente expérimentale, et également contre une infection naturelle sur le terrain. L'activité des vaccins à virus inactivé est évaluée par des tests de vaccination suivis d'une épreuve virulente en utilisant différentes doses de vaccin. Des titres en anticorps neutralisants induits par inoculation des animaux de laboratoire avec le vaccin peuvent être acceptés si une corrélation a été établie avec le développement de l'immunité protectrice.

Des antigènes viraux spécifiques associés à l'induction d'anticorps neutralisants et à la protection contre l'épreuve virulente peuvent être mesurés pour les vaccins à virus inactivé en utilisant pour l'ELISA des AcMs spécifiques, tel que des anticorps neutralisants spécifiques de la protéine S du VGET (43).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ASAGI M., OGAWA T., MINETOMA T., SATO K. & INABA Y. (1986). Detection of transmissible gastroenteritis virus in feces from pigs by reversed passive haemagglutination. *Am. J. Vet. Res.*, **47**, 2161–2164.
2. BAE I., JACKWOOD D.J., BENFIELD D.A., SAIF L.J., WESLEY R.D. & HILL H. (1991). Differentiation of transmissible gastroenteritis virus from porcine respiratory coronavirus and other antigenically related coronaviruses by using cDNA probes specific for the 5' region of the S glycoprotein gene. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 215–218.
3. BERNARD S., BOTTREAU E., AYNAUD, J.M., HAVE P. & SZYMANSKY J. (1989). Natural infection with the porcine respiratory coronavirus induces protective lactogenic immunity against transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Microbiol.*, **21**, 1–8.
4. BERNARD S., LANTIER I., LAUDE H. & AYNAUD J.M. (1986). Detection of transmissible gastroenteritis coronavirus antigens by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay technique. *Am. J. Vet. Res.*, **47**, 2441–2444.
5. BOHL E.H. (1979). Diagnosis of diarrhea in pigs due to transmissible gastroenteritis or rotavirus. *In: Viral Enteritis in Humans and Animals*, Bricout F. & Scherrer R., eds. INSERM, Paris, France, **90**, 341–343.
6. BROWN I.H. & PATON D.J. (1991). Serological studies of transmissible gastroenteritis in Great Britain, using a competitive ELISA. *Vet. Rec.*, **128**, 500–503.
7. CALLEBAUT P., CORREA I., PENSAERT M., JIMENEZ G. & ENJUANES L. (1988). Antigenic differentiation between transmissible gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus. *J. Gen. Virol.*, **69**, 1725–1730.
8. CALLEBAUT P., PENSAERT M.B. & HOOYBERGHS J. (1989). A competitive inhibition ELISA for the differentiation of serum antibodies from pigs infected with transmissible gastroenteritis virus (TGEV) or with the TGEV-related porcine respiratory coronavirus. *Vet. Microbiol.*, **20**, 9–19.
9. COSTANTINI V., LEWIS P., ALSOP J., TEMPLETON C. & SAIF L.J. (2004). Respiratory and enteric shedding of porcine respiratory coronavirus (PRCV) in sentinel weaned pigs and sequence of the partial S gene of the PRCV isolates. *Arch. Virol.*, **149**, 957–974.
10. COX E., HOOYBERGHS J. & PENSAERT M.B. (1990). Sites of replication of a porcine respiratory coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus. *Res. Vet. Sci.*, **48**, 165–169.
11. COX E., PENSAERT M.B. & CALLEBAUT P. (1993). Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs after infection with the porcine respiratory coronavirus. *Vaccine*, **11**, 267–272.
12. DULAC G.C., RUCKERBAUER G.M. & BOULANGER P. (1977). Transmissible gastroenteritis: demonstration of the virus from field specimens by means of cell culture and pig inoculation. *Can. J. Comp. Med.*, **41**, 357–363.
13. ENJUANES L., SOLA I., ALMAZAN F., ORTEGO J., IZETA A., GONZALEZ J.M., ALONSO S., SANCHEZ J.M., ESCORS D., CALVO E., RIQUELME C. & SANCHEZ C. (2001) Coronavirus derived expression systems. *J. Biotechnol.*, **88**, 183–204.
14. ENJUANES L. & VAN DER ZEIJST B.A.M (1995). Molecular basis of transmissible gastroenteritis virus epidemiology. *In: The Coronaviridae*, Siddell, Stuart G., ed. Plenum Press, New York, USA, 337–376.
15. GARWES D.J., STEWART F., CARTWRIGHT S.F. & BROWN I. (1988). Differentiation of porcine respiratory coronavirus from transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Rec.*, **122**, 86–87.
16. HOHDATSU T., EIGUCHI Y., IDE S., BABA H. & YAMAGISHI H. (1987). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of transmissible gastroenteritis virus antibodies. *Vet. Microbiol.*, **13**, 93–97.
17. HONDA E., TAKAHASHI H., OKAZAKI K., MINETOMA T. & KUMAGAI T. (1990). The multiplication of transmissible gastroenteritis viruses in several cell lines originated from porcine kidney and effects of trypsin on the growth of the viruses. *Jpn J. Vet. Sci.*, **52**, 217–224.
18. HUANG C.-C., JONG M.H. & LAI S.Y. (1988). Preparation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit and its application in diagnosis of transmissible gastroenteritis. *Taiwan J. Vet. Med. Anim. Husbandry*, **51**, 57–63.

19. JEAN Y.H., KANG M.I., HWANG E.K., KWON Y.B., CHUNG U.I. & LEE J.B. (1987). Detection of transmissible gastroenteritis virus in tissue by peroxidase–antiperoxidase method. Research Reports Rural Development Administration (Livestock & Veterinary), Korea, **29**, 48–53.
20. KEMENY L.J., WILTSEY V.L. & RILEY J.L. (1975). Upper respiratory infection of lactating sows with transmissible gastroenteritis virus following contact exposure to infected piglets. *Cornell Vet.*, **65**, 352–362.
21. KIM L., CHANG K.O., SESTAK K., PARWANI A & SAIF L.J. (2000). Development of a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay for differential diagnosis of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus from feces and nasal swabs of infected pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 385–388.
22. KIM L., HAYES J., LEWIS P., PARWANI A.V., CHANG K.O. & SAIF L.J. (2000). Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd. *Arch. Virol.*, **145**, 1133–1147.
23. KIM S.Y., SONG D.S. & PARK B.K. (2001). Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 516–520.
24. LABADIE J.P., AYNAUD J.M., VAISAIRE J. & RENAULT L. (1977). Porcine transmissible gastroenteritis. Antibody detection by passive haemagglutination test: applications to diagnosis and epidemiology. *Rec. Med. Vet.*, **153**, 931–936.
25. LANZA I., SHOUP D.I. & SAIF L.J. (1995). Lactogenic immunity and milk antibody isotypes to transmissible gastroenteritis virus in sows exposed to porcine respiratory coronavirus during pregnancy. *Am. J. Vet. Res.*, **56**, 739–748.
26. LIU C., KOKUHO T., KUBOTA T., WATANABE S., INUMARU S., YOKOMIZO Y. & ONODERA T. (2001). A serodiagnostic ELISA using recombinant antigen of swine transmissible gastroenteritis virus nucleoprotein. *J. Vet. Med. Sci.*, **63**, 1253–1256.
27. MCCLURKIN A.W. & NORMAN J.O. (1966). Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med.*, **30**, 190–198.
28. MCGOLDRICK A., LOWINGS J.P. & PATON D.J. (1999). Characterization of a recent virulent transmissible gastroenteritis virus from Britain with a deleted ORF 3a. *Arch. Virol.*, **144**, 763–770.
29. NELSON L.D. & KEHLING C.L. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of transmissible gastroenteritis virus antibody in swine sera. *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 1645–1657.
30. NODA M., YAMASHITA H., ICOIDE F., KODOI K., ORNON T., ASAGI M. & INABA Y. (1987). Haemagglutination with transmissible gastroenteritis. *Arch. Virol.*, **96**, 109–115.
31. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (2001). World Animal Health in 2001, Part 2, Tables on Animal Health Status and Disease Control Methods. OIE, 12 rue de Prony, 75017 Paris, France.
32. O'TOOLE D., BROWN I.H., BRIDGES A. & CARTWRIGHT S.F. (1989). Pathogenicity of experimental infection with 'pneumotropic' porcine coronavirus. *Res. Vet. Sci.*, **47**, 23–29.
33. PARK S., SESTAK K., HODGINS D.C., SHOUP D.I., WARD L.A., JACKWOOD D.J. & SAIF L.J. (1998). Immune response of sows vaccinated with attenuated transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and recombinant TGEV spike protein vaccine and protection of their suckling piglets against virulent TGEV challenge. *Am. J. Vet. Res.*, **59**, 1002–1008.
34. PATON D.J. & BROWN I.H. (1990). Sows infected in pregnancy with porcine respiratory coronavirus show no evidence of protecting their suckling piglets against transmissible gastroenteritis. *Vet. Res. Commun.*, **14**, 329.
35. PATON D.J., BROWN I.H. & VAZ E.K. (1991). An ELISA for the detection of serum antibodies to both transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Br. Vet. J.*, **147**, 370–372.
36. PATON D.J., IBATA G., MCGOLDRICK A., JONES T.O. & PRITCHARD G.C. (1998). Attempted isolation and characterisation of recent British isolates of transmissible gastroenteritis. Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, UK, 5–9 July 1998.

37. PATON D., IBATA G., SANDS J. & MCGOLDRICK A. (1997). Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus. *J. Virol. Methods*, **66**, 303–309.
38. PATON D. & LOWINGS P. (1997). Discrimination between transmissible gastroenteritis virus isolates. *Arch. Virol.*, **142**, 1703–1711.
39. PENSART M., CALLEBAUT P. & VERGOTE J. (1986). Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet. Q.*, **8**, 257–261.
40. PENSART M.B., HALTERMAN E.O. & BERNSTEIN T. (1968). Diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs by means of immunofluorescence. *Can. J. Comp. Med.*, **32**, 555–561.
41. RASSCHAERT D., DUARTE M. & LAUDE H. (1990). Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2599–2607.
42. RUKHADZE G.G., ALIPER T.I. & SERGEEV V.A. (1989). Isolation of peplomer glycoprotein E2 of transmissible gastroenteritis virus and application in enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1754–1758.
43. SAIF L.J. (1993). Coronavirus immunogens. *Vet. Microbiol.*, **37**, 285–297.
44. SAIF L.J., BOHL E.H., KOHLER E.M. & HUGHES J.H. (1977). Immune electron microscopy of transmissible gastroenteritis virus and rotavirus (reovirus-like agent) of swine. *Am. J. Vet. Res.*, **38**, 13–20.
45. SAIF L.J. & JACKWOOD D.J. (1990). Enteric virus vaccines: Theoretical considerations, current status and future approaches. In: *Viral Diarrheas of Man and Animals*, Saif L.J. & Theil K.W., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 313–329.
46. SAIF L.J. & SESTAK K. (2006). Transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. In: *Diseases of Swine*, Ninth Edition, B.E. Straw *et al.*, eds. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 489–516.
47. SCHULTZE B., KREMPL C., BALLESTEROS M.L., SHAW L., SCHAUER R., ENJUANES L. & HERRLER G. (1996). Transmissible gastroenteritis coronavirus, but the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N-glycolylneuramic acid) binding activity. *J. Virol.*, **70**, 5634–5637.
48. SESTAK K., LANZA I., PARK S.K., WEILNAU P. & SAIF L.J. (1996). Contribution of passive immunity to porcine respiratory coronavirus to protection against transmissible gastroenteritis virus challenge exposure in suckling pigs. *Am. J. Vet. Res.*, **5**, 664–671.
49. SESTAK K., MEISTER R.K., HAYES J.R., KIM L., LEWIS P.A., MYERS G. & SAIF L.J. (1999). Active immunity and T-cell populations in pigs intraperitoneally inoculated with baculovirus-expressed transmissible gastroenteritis virus structural proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **70**, 203–221.
50. SESTAK K., ZHOU Z., SHOUP D.I. & SAIF L.J. (1999). Evaluation of the baculovirus-expressed S glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) as antigen in a competition ELISA to differentiate porcine respiratory coronavirus from TGEV antibodies in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 205–214.
51. SHIMIZU M. & SHIMIZU Y. (1977). Micro-indirect haemagglutination test for detection of antibody against transmissible gastroenteritis virus of pigs. *J. Clin. Microbiol.*, **6**, 91–95.
52. SHOUP D., JACKWOOD D.J. & SAIF L.J. (1997). Active and passive immune responses to transmissible gastroenteritis virus (TGEV) in swine inoculated with recombinant baculovirus-expressed TGEV spike glycoprotein vaccines. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 242–250.
53. SHOUP D.I., SWAYNE D.E., JACKWOOD D.J. & SAIF L.J. (1996). Immunohistochemistry of transmissible gastroenteritis virus antigens in fixed paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 161–167.
54. SIMKINS R.A., WEILNAU P.A., BIAS J. & SAIF L.J. (1992). Antigenic variation among transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus strains detected with monoclonal antibodies to the S protein of TGEV. *Am. J. Vet. Res.*, **53**, 1253–1258.
55. SIRINARUMITR T., PAUL P.S., KLUGE J.P. & HALBUR P.G. (1996). *In situ* hybridization technique for the detection of swine enteric and respiratory coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV), in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J. Virol. Methods*, **56**, 149–160.

56. SMERDOU C., URNIZA A., CURTIS III R. & ENJUANES L. (1996). Characterization of transmissible gastroenteritis coronavirus S protein expression products in avirulent *S. typhimurium* mit/Deltacya/mit/Deltacrp: persistence, stability and immune response in swine. *Vet. Microbiol.*, **48**, 87–100.
57. TORRES J.M., COVADONGA A., ORTEGA A., MITTAL S., GRAHAM F. & ENJUANES L. (1996). Tropism of human adenovirus type 5-based vectors in swine and their ability to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus. *J. Virol.*, **70**, 3770–3780.
58. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (1995). Code Of Federal Regulations, Title 9, Parts 1–199. US Government Printing Office, Washington D.C., USA.
59. VAN COTT J., BRIM T., LUNNEY J. & SAIF L.J. (1994). Contribution of antibody secreting cells induced in mucosal lymphoid tissues of pigs inoculated with respiratory or enteric strains of coronavirus to immunity against enteric coronavirus challenge. *J. Immunol.*, **152**, 3980–3990.
60. VAN NIEUWSTADT A.P. & BOONSTRA J. (1991). A competitive ELISA to distinguish TGEV- from PRCV-infected pigs. International Pig Veterinary Society Proceedings 1990, 265.
61. VAN NIEUWSTADT A.P., CORNELISSEN J.B. & VREESWIJK J. (1988). Solid phase immune electron microscopy for diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs. *Res. Vet. Sci.*, **44**, 286–294.
62. VAN NIEUWSTADT A.P., CORNELISSEN J.B. & ZETSTRA T. (1988). Comparison of two methods for detection of transmissible gastroenteritis virus in feces of pigs with experimentally induced infection. *Am. J. Vet. Res.*, **49**, 1836–1843.
63. WITTE K.H. (1971). Micro-colour test for assay of transmissible gastroenteritis virus neutralizing antibodies. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **33**, 171–176.
64. WOODS R.D. (1997). Development of PCR-based techniques to identify porcine transmissible gastroenteritis coronavirus isolates. *Can. J. Vet. Res.*, **61**, 167–172.
65. YOUNT B., CURTIS K. & BARIC R. (2000). Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: Transmissible gastroenteritis virus model. *J. Virol.*, **74**, 10600–10611.
66. ZHANG X., HASOKSUZ M., SPIRO D., HALPIN R., WANG S., STOLLAR S., JANIES D., HADYA N., TANG Y., GHEDIN E. & SAIF L.J. (2007). Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in non-structural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Virology*, **358**, 424–435.

*
* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la gastroentérite transmissible (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 2.9.

AUTRES MALADIES¹

CHAPITRE 2.9.1.

MALADIES ANIMALES À BUNYAVIRUS (Fièvre de la Vallée du Rift non comprise)*

RÉSUMÉ

Parmi le groupe grand et complexe des arbovirus, la famille des Bunyaviridae avec plus de 300 membres se répartit sur 5 genres. Deux genres sont d'importance vétérinaire, il s'agit du genre Nairovirus, auquel appartient un agent pathogène des ruminants, le virus de la maladie du mouton de Nairobi (MMN), et le genre qui comprend le plus grand nombre de virus, celui des Orthobunyavirus, lui-même subdivisé en 48 sérogroupes. Ce genre ne comprend que quelques virus ayant un pouvoir pathogène significatif pour les animaux, parmi lesquels se trouvent le virus de la Cache Valley (CVV) et le virus Akabane. Bien qu'ils aient été classés dans des groupes antigéniques différents, ces deux virus ont tous deux un tropisme pour les organes du fœtus et sont responsables de pertes embryonnaires ou fœtales, ainsi que de nombreuses malformations congénitales chez les ruminants domestiques. Les membres des genres Nairovirus et Orthobunyavirus sont des virus enveloppés à ARN simple brin, sphériques ou pléomorphiques (de 80 à 110 nm de diamètre). Un troisième membre d'importance vétérinaire de la famille des Bunyaviridae est le virus de la fièvre de la Vallée du Rift qui appartient au genre Phlebovirus et qui est décrit dans le Chapitre 2.1.14.

Identification de l'agent pathogène :

Le virus de la Cache Valley (CVV), qui fait partie du séro groupe Bunyawera au sein du genre Orthobunyaviridae, peut être isolé du sang d'animaux adultes fiévreux et anémiques. Les essais d'isolement du virus à partir du fœtus à la naissance sont généralement voués à l'échec du fait de la neutralisation du virus par la réponse immune du fœtus. L'isolement du virus est réalisé en général sur lignées cellulaires de singe ou de hamster nouveau-nés, mais il est aussi possible par inoculation intra-cérébrale à de jeunes souris. Le virus ou l'antigène est identifié par des tests de fluorescence (IF), d'immunohistochimie (IHC) ou de neutralisation du virus. Des techniques de réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), spécifiques de groupes et de virus, ont été développées pour les Orthobunyavirus.

Le virus Akabane peut être isolé du sang d'animaux virémiques, et parfois de fœtus, en employant des cellules de singes, de hamsters nouveau-nés ou de moustiques. Les virus provoquent des malformations dans les embryons de poulets en développement. On peut recourir à l'inoculation dans le sac vitellin de l'œuf ou à l'inoculation intra-cérébrale au souriceau nouveau-né. Le virus ou l'antigène est identifié par des tests d'IF, d'IHC ou de neutralisation. Des techniques de transcription inverse couplée à une PCR, soit nichée soit multiplexe en temps réel, ont été mises au point pour le virus Akabane et les virus apparentés.

Le virus de la maladie de Nairobi est le plus facilement isolé à partir du plasma d'animaux fiévreux, des nœuds lymphatiques mésentériques ou de la rate. Les moutons de laboratoire, les souris

¹ Les maladies de cette section qui sont marquées d'un astérisque sont décrites dans d'autres chapitres du *Manuel Terrestre* au niveau des sections propres à des espèces en particulier. Les chapitres de cette section traitent de plusieurs espèces et apportent une description plus large.

non sevrés de 2 à 4 jours inoculés par voie intracérébrale ou les cultures cellulaires peuvent être utilisés pour un premier isolement. Les moutons sont les animaux les plus sensibles pour cet isolement, de même que les cellules les plus sensibles sont les cellules de lignée continue de reins de hamster nouveau-né ou les cellules de première explantation de reins de hamster ou d'agneau. Un second passage, par inoculation du plasma d'un mouton expérimentalement infecté à des cellules ou à des souris, est également recommandé. L'identification du virus peut être réalisée par immunofluorescence directe sur des calques d'encéphale de souris ou sur des cultures cellulaires inoculées. L'épreuve d'immunodiffusion en gélose peut également permettre de démontrer la présence de l'antigène viral de la MMN dans les organes, mais des réactions croisées avec d'autres virus du genre Nairovirus peuvent apparaître. Les antigènes nécessaires pour les tests de FC ou immuno-enzymatiques (ELISA) peuvent être préparés à partir de cultures cellulaires ou de broyats de cerveaux de souris infectées.

Épreuves sérologiques : ce sont les épreuves d'inhibition de l'hémagglutination, de fixation du complément (FC) et de neutralisation virale qui sont utilisées pour détecter les anticorps du CVV et du virus Akabane. Un ELISA, basé sur celui qui est utilisé pour la fièvre de la Vallée du Rift, a été également décrit. Un ELISA de compétition a également été décrit pour la maladie d'Akabane. L'épreuve la plus appropriée pour la MMN est l'épreuve d'immunofluorescence indirecte. Les épreuves de FC et d'hémagglutination indirecte ont également été utilisées pour confirmer des foyers de MMN sur le terrain. Les épreuves de neutralisation virale donnent des résultats difficiles à interpréter, comme c'est aussi le cas avec les autres membres du groupe des Nairovirus. Des ELISAs sont en cours d'évaluation pour la MMN. Des rates infectées peuvent être utilisées comme source d'antigène pour les épreuves d'immunodiffusion.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : il n'existe pas actuellement de vaccin contre l'infection par le VVC. Des vaccins du virus Akabane ont été produits au Japon et en Australie pour usage dans ces pays. En ce qui concerne la MMN, un vaccin expérimental à virus atténué vivant a été étudié, et un vaccin à virus inactivé produit sur culture cellulaire s'est avéré immunogène.

A. INTRODUCTION

• Virus de la Cache Valley

Le virus de la Cache Valley (CVV) est un *Orthobunyavirus* tétrogène d'Amérique du Nord qui affecte surtout les moutons. Une enquête sérologique récente a montré que près de 28 % des bovins présentaient des anticorps spécifiques anti-CVV (35). Au sein de la famille des *Bunyaviridae*, ce virus est membre du sérogroupe *Bunyamwera* et appartient au genre *Orthobunyavirus* (19) ; c'est l'*Orthobunyavirus* le plus largement répandu en Amérique du Nord (4). Le CVV a été isolé pour la première fois d'un broyat de moustiques en Utah, États-Unis d'Amérique (USA) en 1956 (20), mais il ne fut reconnu responsable de la maladie que plus tard, en 1987, au cours d'un épisode de mortalité d'agneaux nouveau-nés et de malformations d'agneaux qui survint dans un troupeau ovin au Texas (9). Le virus a été également isolé d'un cheval, ainsi que d'une vache qui ne présentait aucun signe clinique.

Des enquêtes sérologiques ont révélé la présence d'anticorps du CVV chez les ruminants domestiques et sauvages, et les chevaux. La prévalence sérologique est élevée chez les cerfs et la virémie qui dure de 1 à 3 jours chez ce dernier lui permet d'infecter les vecteurs et d'agir comme un hôte amplificateur (2). Les vecteurs sont autant des moucheron *Culicoides* que des moustiques des groupes *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia* et *Culiseta*.

Chez les animaux adultes, l'infection est en général sub-clinique et les brebis infectées expérimentalement ne présentent qu'une réaction fébrile passagère associée à une virémie détectable. La maladie a été signalée à deux reprises chez l'homme (5, 36).

Le CVV a été le premier *Orthobunyavirus* à avoir été associé en Amérique du Nord à de l'arthrogrypose et de l'hydranencéphalie chez des fœtus, mais expérimentalement d'autres virus apparentés ont montré le même pouvoir pathogène. Les conséquences de l'infection du fœtus par le CVV dépendent de l'âge. Les malformations apparaissent lorsque l'infection a lieu entre le 27^e et 45^e jours de la gestation ; une infection entre le 28^e et le 36^e jour de gestation entraîne des lésions du système nerveux central (SNC) et des muscles squelettiques ; et une infection entre le 37^e et le 42^e jours entraîne uniquement des malformations des muscles squelettiques. Une infection après le 50^e jour n'entraîne aucune lésion et, après le 76^e jour, le fœtus étant immunocompétent des

anticorps apparaissent. La mort des fœtus infectés par le VVC survient le plus souvent entre le 27^e et le 35^e jour de gestation, mais en fait ils restent sensibles à tout âge, ce qui montre le tropisme de nombreux bunyavirus pour leurs tissus (6).

L'arthrogrypose d'un ou plusieurs membres, un torticolis, une scoliose de la colonne vertébrale et une hypoplasie musculaire sont parmi les principales lésions macroscopiques du système musculo-squelettique. Parmi les lésions du SNC, on note de l'hydranencéphalie, de l'hydrocéphalie, une porencéphalie, une microencéphalie, de l'hypoplasie du cerveau et du cervelet, et de la micromélie (6, 18). On retrouve aussi des embryons morts et des agneaux morts nés ou momifiés. On observe de l'anarsaque et de l'oligohydramnios ; on pense que la fuite du liquide amniotique contribue vraisemblablement à la diminution des mouvements du fœtus et par conséquent aux malformations du squelette. Les lésions des membres sont également dues à des modifications neuro-dégénératives que l'on observe en histopathologie sous forme de zones de nécrose et d'une perte dans le cerveau du neuropil paraventriculaire associée à une diminution du nombre de neurones moteurs. Les modifications musculaires sont dues à un faible développement des myocytes myotubulaires (18).

- **Le virus Akabane**

Le virus Akabane est un *Orthobunyavirus* tératogène largement répandu à travers le monde sauf dans les pays du Nouveau Monde. Il touche essentiellement les bovins. C'est un membre du séro groupe Akabane, du genre *Orthobunyavirus*, famille *Bunyaviridae* (24). D'autres *Orthobunyavirus* sont des agents pathogènes potentiels, notamment : Aino (séro groupe Shuni), Peaton (séro groupe Shamonda), Douglas (séro groupe Sathuperi) et Tinaroo (séro groupe Akabane). Toutefois, le virus Akabane est le mieux étudié et le plus pathogène des *Orthobunyavirus* ; il est la cause principale de l'arthrogrypose et de l'hydranencéphalie.

Le virus Akabane a été isolé pour la première fois au Japon en 1959 d'abord d'un mélange de moustiques puis d'un mélange de culicoïdes. En 1972, suivirent des isollements à partir de culicoïdes en Australie et de mélange de moustiques en Afrique. Des anticorps anti-Akabane ont été trouvés dans des sérums de bovins, moutons, chèvres, chevaux, buffles et chameaux. En Afrique sub-saharienne, de nombreuses espèces de gibiers possèdent des anticorps neutralisants anti-Akabane. L'aire de répartition du virus Akabane s'étend sur le Moyen-Orient, l'Asie, Chypre et l'Afrique, mais c'est en Australie et au Japon que surviennent, de façon régulière, des épizooties. Les conditions favorables à l'apparition de tels épizooties sont i) la présence d'animaux sensibles dans les premiers temps de la gestation et ii) l'augmentation soudaine de la population des vecteurs, notamment quand le virus a été absent plusieurs années.

L'infection par le virus Akabane est en général sub-clinique chez l'animal adulte, mais récemment des cas d'encéphalomyélite ont été rapportés à une infection de bovins par le virus Akabane (28). Les bovins développent des anticorps après 3 à 4 jours de virémie.

Dans les zones d'enzootie, la présence d'anticorps chez une femelle gestante protège le fœtus contre l'infection, mais le virus Akabane peut entraîner une infection à long terme du placenta chez les bovins et les moutons sensibles. Celle-ci s'installe entre le 30^e et le 70^e jour de gestation chez la brebis et entre le 30^e et le 150^e jour chez la vache. Le virus Akabane a un tropisme particulier pour le cerveau, la moelle épinière et les muscles, là où une nécrose non-inflammatoire peut interférer avec la morphogénèse.

L'infection par le virus Akabane a été étudiée expérimentalement chez les moutons et les chèvres avec apparition d'arthrogrypose/hydranencéphalie, de kyphoses, de scolioses, de micro- et por-encéphalies, de mortinatalités et d'avortements (34). L'infection naturelle de fœtus ovins a été décrite en Australie avec, le plus fréquemment observé, une mortalité périnatale et de la micro-encéphalie congénitale.

L'infection expérimentale de vaches gestantes par le virus Akabane a montré que le type de la malformation dépend du stade de la gestation ; hydroencéphalie entre le 76^e et le 104^e jour et arthrogrypose entre le 103^e et le 174^e jour de gestation (25). Cette différence dans le temps associée aux malformations observées est particulièrement nette sur les fœtus bovins, tandis que chez les moutons, du fait de la durée plus courte de la gestation, les lésions du cerveau et du squelette apparaissent en même temps. La séquence des événements au cours d'une épizootie par le virus Akabane induisant des pertes fœtales est la suivante : incoordination motrice des veaux à la naissance, puis arthrogrypose et modifications dysplasiques des muscles et enfin, hydroencéphalie et autres lésions graves du SNC. Ces événements peuvent être précédés par de la mortinatalité et des avortements (37). Le virus Akabane est responsable de malformations musculaire et cérébrale et les lésions qu'il provoque sont caractérisées par une encéphalomyélite non-purulente, une encéphalomyélite focale dégénérative, une por-encéphalie, une micro-encéphalie, un hydro-encéphale, la perte des cornes ventrales des neurones moteurs et des axones, une déplétion de la myéline dans les tractus moteurs de la moelle épinière, de la nécrose et de la polymyosite dans les myotubules avec une dégénérescence des muscles squelettiques. Au niveau de la moelle épinière, on observe de la scoliose, et pratiquement toutes les articulations sont touchées par de la kyphose et de l'arthrogrypose.

- **La maladie du mouton de Nairobi**

La maladie du mouton de Nairobi (MMN) est causée par un *Nairovirus* de la famille des *Bunyaviridae* (11). Elle est caractérisée par un taux de mortalité variant de 40 % à 90 %, et devrait être toujours suspectée quand des animaux ont été récemment transportés de zones indemnes vers des zones où la maladie est enzootique. Les foyers surviennent aussi lors d'incursions de tiques dans des régions auparavant indemnes, notamment à la suite de saisons des pluies abondantes (12). Les symptômes sont semblables chez les moutons et les chèvres, bien qu'il existe des différences de sensibilité selon les souches du virus et les races d'animaux, certaines étant plus sensibles que d'autres. Les bovins et le gibier sont réfractaires à l'infection par le virus de la MMN (43). La durée de la période d'incubation varie de 2 à 5 jours, puis la réaction fébrile entre 41 et 42 °C s'installe. On note de l'hyperventilation accompagnée par un abattement grave, de l'anorexie, et un refus de se déplacer. Les animaux se tiennent la tête baissée avec une conjonctivite et un jetage séro-hémorragique. Certains nœuds lymphatiques superficiels tels que les nœuds préscapulaires et/ou précuraux deviennent palpables. La diarrhée apparaît en général en 36 à 56 h après le début de la réaction fébrile. Elle est d'abord profuse, aqueuse et fétide, puis elle devient hémorragique et muqueuse, accompagnée de coliques et du ténésme. L'avortement est une séquelle fréquente de l'infection. L'examen des sites de prédilection des tiques pour leur fixation comme les oreilles, la tête et le corps révélera vraisemblablement la présence de tiques *Rhipicephalus appendiculatus*.

Dans les cas suraigus, la mort peut survenir dans les 12 h suivant le début de la fièvre, et à tout moment au cours de la phase fébrile, quand l'animal est malade. D'autres morts surviennent pendant les 3 à 7 jours suivants, après la baisse de la température, et sont associées à une diarrhée sévère et une déshydratation.

Les lésions macroscopiques peuvent porter à confusion car la plupart des morts surviennent plutôt pendant la période de virémie quand les seuls signes possibles sont une adénite avec des pétéchies et des hémorragies ecchymotiques à la surface du tractus digestif, de la rate, du cœur et d'autres organes. Aucun de ces signes n'autorise un diagnostic précis de MMN même en cas de suspicion, car ils sont communs à d'autres maladies fébriles du mouton dans les zones d'enzootie de la MMN. Les maladies avec lesquelles il est possible de confondre la MMN sont la fièvre de la Vallée du Rift, la peste des petits ruminants, la peste bovine, la salmonellose et la cowdriose. Plus tard au cours de la maladie, une gastro-entérite hémorragique devient de plus en plus évidente avec des hémorragies sur la muqueuse de la caillette, notamment le long des plis, près de la valvule iléo-caecale, et plus fréquemment sur le colon et le rectum. Des zébrures au niveau du rectum sont fréquentes. La vésicule biliaire est hypertrophiée et hémorragique. Des lésions inflammatoires avec des hémorragies sont notables dans le tractus génital des femelles, si un avortement a eu lieu. Cependant, chez beaucoup d'animaux morts de MMN, les lésions de gastro-entérite peuvent être absentes et un diagnostic basé sur un examen *post mortem* est rarement réalisé. Les lésions histopathologiques courantes sont une dégénérescence du myocarde, une néphrite et une nécrose de la vésicule biliaire.

Les signes *post mortem* observables au cours des premiers stades de la MMN ne sont pas spécifiques. Il s'agit de congestion, pétéchies et hémorragies ecchymotiques à la surface des séreuses, dans les nœuds lymphatiques, sur la rate et d'autres organes tels que les reins, les poumons et le foie. Si la mort survient au cours des stades ultérieurs, la gastro-entérite devient apparente avec des ulcères sur la caillette, le duodénum, le caecum et le colon. La MMN est transmise principalement par les tiques *Rhipicephalus appendiculatus*, et l'infestation par ce parasite tique doit attirer l'attention. Le virus de la MMN peut également être transmis par d'autres espèces de tiques du genre *Rhipicephalus*, et par la tique *Amblyomma variegatum*.

Il semblerait que la MMN puisse exceptionnellement être à l'origine d'une zoonose naturelle, entraînant une affection pseudo-grippale bénigne chez l'homme. Des infections au laboratoire ont été associées de la fièvre et des douleurs articulaires (43).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

- **Le virus de la Cache Valley**

Le virus de la Cache Valley ne peut pas être isolé du fœtus à la naissance, mais il a été isolé de broyats totaux de moustiques et du sang d'animaux adultes virémiques. Cet isolement a été réalisé sur des lignées cellulaires de reins de hamsters et de singes, dont les lignées de rein de hamster nouveau né (BHK), de rein de singe vert (Vero) et LLC-MK2. Le virus peut être isolé chez un animal en phase fébrile, à partir d'une suspension à 10 % de la fraction leucocytaire (buffy coat) en milieu essentiel minimum (MEM), en co-culture avec des cellules Vero dans du MEM enrichi de 2 % de sérum de fœtus de veau.

L'isolement est aussi couramment réalisé par inoculation intracérébrale ou intrapéritonéale au souriceau nouveau-né ou sevré.

Beaucoup de *Orthobunyavirus* ont été séquencés, car ce sont des agents pathogènes importants en médecine, associés à des cas d'encéphalites humaines en Amériques du Nord comme du Sud. Des techniques de réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été appliquées à la surveillance épidémiologique par recherche du virus dans les broyats totaux de moustiques, en remplacement de l'inoculation aux souriceaux. Selon certains auteurs, la sensibilité de cette technique permettait de détecter un moustique infecté dans un broyat total de 100, ce qui est impossible par la technique traditionnelle des plages en culture cellulaire (21).

Des amorces spécifiques de groupe et spécifiques de virus ont été préparées, et en utilisant la technique de la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR), il a été possible de distinguer les sérogroupes de virus Bunyamwera (BUN) et California (CAL). En utilisant une technique de RT-PCR nichée, les virus des sérogroupes CAL et BUN peuvent être distingués des autres membres du genre *Orthobunyavirus* (26, 31).

- **Le virus Akabane**

Le diagnostic de l'infection est rarement réalisé par isolement du virus, mais plutôt par analyses histopathologique ou sérologique. Toutefois, le virus a été isolé à partir de la couche leuco-plaquettaire d'animaux sentinelles virémiques, de broyats totaux d'insectes vecteurs et parfois d'organes du fœtus. Certains ont utilisé la RT-PCR pour rechercher le virus Akabane et le différencier du virus Aino. Cela peut aider le diagnostic mais, compte tenu de la diversité qui règne au sein du genre *Orthobunyavirus*, la validité de l'épreuve devra être confirmée car on sait qu'il existe des réassortiments.

Des souriceaux à la mamelle de 1 à 2 jours sont aussi utilisés ; ils sont inoculés par voie intracérébrale avec 0,01 ml d'une suspension clarifiée contenant 10 % de l'échantillon à analyser. Une procédure sensible pour l'isolement des virus de ce séro groupe consiste en l'inoculation intraveineuse d'œufs embryonnés de poule, suivie par des passages du matériel récolté sur cellules d'insecte (C6/36), puis sur cellules de mammifères (22, 42). L'isolement du virus en culture cellulaire est souvent réalisé sur cellules de lignées Vero, BHK-21 et HmLu-1. En cas d'utilisation de cellules C6/36 de moustiques, les cultures sont laissées au repos pendant 7 jours et l'échantillon est propagé une seconde fois en lignées cellulaires de hamster ou sur cellules Vero, sur lesquelles les effets cytopathogènes (ECP) du virus deviennent apparents.

Les méthodes pour identifier de façon spécifique le virus Akabane en utilisant des anticorps monospécifiques comprennent la neutralisation virale et l'immunofluorescence (3, 22). La détection de l'antigène a été possible dans des prélèvements réalisés sur des fœtus bovins ou ovins ainsi que sur des veaux nouveaux nés infectés, fixés au formol puis colorés à la peroxydase (33). Des méthodes de détection de l'acide nucléique ont également été mises au point ; ils permettent de différencier les virus Aino et Akabane en utilisant une technique de RT-PCR nichée suivie d'une digestion par des enzymes de restriction pour différencier les virus Akabane et Tinaroo dans le même séro groupe et les virus Aino et Peaton dans les sérogroupes Shuni et Shamonda (1). Une RT-PCR multiplex en temps réel a aussi été décrite qui utilise des sondes TaqMan ; il semblerait qu'elle soit fiable pour identifier de façon précise les virus Akabane et Aino (38).

- **La maladie du mouton de Nairobi**

Le virus de la MMN peut être isolé de prélèvements faits sur le terrain en utilisant des animaux de laboratoire ou des cultures cellulaires (16). Les personnes manipulant ce virus doivent prendre toutes les précautions nécessaires contre une infection possible par aérosols. Les meilleurs prélèvements, effectués sur des animaux fébriles ou morts, sont constitués par du sang non coagulé, des nœuds lymphatiques mésentériques et la rate conservée au froid. Le plasma peut être inoculé directement ; les nœuds lymphatiques ou la rate doivent être homogénéisés dans un milieu de transport, sous la forme d'une suspension à 10 % environ (poids/vol.). Ce milieu de transport peut être constitué par du milieu de Hanks additionné de 0,5 % d'hydrolysat de lactalbumine, de 0,75 % de sérum albumine bovine, de pénicilline (500 Unités Internationales [UI]/ml), de sulfate de streptomycine (500 µg/ml), et de mycostatine (50 unités/ml) ou de fungizone (2,5 µg/ml).

La première étape recommandée pour le diagnostic est l'inoculation de 1 à 2 ml de la suspension tissulaire précédemment décrite, ou de plasma, à des moutons sensibles à la MMN hébergés en bergerie confinée. Toute fièvre ou symptômes apparus à la suite de cette inoculation orienteront vers un diagnostic de MMN et permettront par la même occasion de réaliser d'excellents prélèvements pour isoler le virus. Ceci est particulièrement indiqué lorsque les prélèvements de terrain ont été transportés en pays chauds, le virus perdant alors nécessairement de son titre. Les moutons sont au moins 100 fois plus sensibles que les souris à l'infection par le virus de la MMN.

Des souriceaux de 1 à 2 jours peuvent être inoculés par voie intracérébrale avec 0,01 ml d'une dilution au 1/10 de plasma ou de tissus en suspension. Deux portées de 8 à 10 souriceaux à la mamelle doivent être utilisées pour

chacun des prélèvements, qui seront inoculés par voie intracérébrale, un passage aveugle étant réalisé de façon systématique. Les souris s'affaiblissent et meurent 5 à 9 jours après leur inoculation. Leurs encéphales doivent être recueillis stérilement, mélangés et dilués au 1/100 en vue d'un passage sur des souris supplémentaires.

Les cultures cellulaires peuvent être utilisées en même temps que l'inoculation à la souris pour un premier isolement de virus de la MMN, puisqu'elles se sont avérées d'une sensibilité équivalente à celle de l'inoculation intracérébrale au souriceau non sevré. La lignée BHK-21-C13 est particulièrement indiquée. La lignée cellulaire Vero (37), ainsi que des cellules rénales d'agneau ou de hamster, après 1 ou 2 passages, ont également été employées. La plupart des souches de virus de la MMN produisent un ECP lors d'un premier passage en cellules BHK ; d'autres produisent un effet plus visible lors du second passage. L'apparition d'un ECP n'est pas systématique sur les cellules testiculaires et rénales d'agneaux, mais il est généralement observé dès le second passage en cellules rénales d'agneaux. Les tubes de culture cellulaire doivent être utilisés à la fois avec et sans lamelles ; si on utilise des flacons en plastique, des cultures sur lame porte-objet avec micro-puits doivent être aussi préparées. Environ 0,2 ml doivent être inoculés, puis laissés 1 à 2 h au contact des cellules pour permettre l'adsorption du virus. En tubes roulants, l'ECP sur les cellules BHK devient visible après 24 à 48 h sous forme de foyers de cellules arrondies et granuleuses, et dans les 24 à 48 h suivantes sur les autres types de cellules. L'ECP n'étant pas spécifique du virus de la MMN, il doit être identifié par une épreuve d'immunofluorescence ou par une coloration à l'hématoxyline/éosine. Cette dernière méthode révèle des inclusions éosinophiles pléomorphiques dans le cytoplasme, en particulier en forme de fuseau. Les autres inclusions sont bipolaires, ou entourent le nucléus.

Le virus peut être identifié de façon spécifique par une épreuve d'immunofluorescence, dont les résultats peuvent s'avérer positifs dès 24 à 48 h après l'inoculation, alors qu'aucun ECP ne s'est encore manifesté. Les conjugués destinés à l'épreuve d'immunofluorescence directe peuvent être préparés par des méthodes normalisées à partir du liquide d'ascite de souris hyperimmunisées et d'antisérums de lapins ou de moutons. Quelques réactions d'immunofluorescence croisées peuvent se produire avec d'autres *Nairovirus* aux basses dilutions du conjugué, mais ces virus ne sont généralement pas associés avec des maladies des ovins ou des caprins.

L'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) peut s'avérer précieuse pour réaliser un premier diagnostic par détection de l'antigène du virus de la MMN dans les organes. L'épreuve peut être réalisée dans des laboratoires ne disposant pas de cultures cellulaires et dans des laboratoires de terrain. La rate et les nœuds lymphatiques mésentériques sont les organes de choix pour réaliser cette épreuve. Des aliquotes de 0,5 à 1 g doivent être homogénéisées dans un mortier en présence de sable stérile ou dans un broyeur à moteur de façon à obtenir des suspensions de 10 à 20 % en solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) ou en solution saline. La suspension doit être centrifugée 10 à 15 min à 1 000 *g* environ et c'est le liquide surnageant qui est utilisé pour l'épreuve. Cette épreuve peut aussi servir à caractériser l'antigène viral présent dans l'encéphale de souris infectées expérimentalement (voir ci-dessus). Le sérum de lapin hyper immunisé contre le virus de la MMN peut être préparé par inoculations répétées à cet animal d'encéphale de souris infectées par le virus de la MMN. Une suspension d'encéphale entre 2 et 5 % (poids/vol.) est préparée comme indiqué ci-dessus et centrifugée de 3 à 5 000 *g* pendant 15 min. Des aliquotes sont alors mélangées à un égal volume d'adjuvant Eg Titremax. Divers protocoles d'immunisation peuvent être employés, des doses de 1 ml pouvant être administrées par voie sous-cutanée ou intramusculaire à 7 jours d'intervalle pendant 3 à 5 semaines, ou plusieurs doses de 0,1 ml pouvant être inoculées en des points différents du corps selon le même calendrier. Le sérum doit être récolté 5 à 7 jours après la dernière injection et conservé en aliquotes à -20 °C.

Une gélose Difco Noble ou toute autre gélose appropriée diluée dans une solution de chlorure de sodium à 0,85 % de pH 7,2 peut être utilisée pour réaliser cette épreuve. Les lames porte-objet sont recouvertes d'une couche de gélose d'environ 2 mm d'épaisseur. Six puits numérotés de 1 à 6 sont creusés aux coins d'un hexagone entourant un puits central. Le sérum du lapin hyperimmunisé est déposé dans le puits central et des antigènes témoins positifs sont placés dans les puits 1 et 4. Le prélèvement d'organes à analyser est placé dans les puits 2 et 5. Un prélèvement témoin négatif est placé dans les puits 3 et 6. Les puits contenant le prélèvement à analyser en face desquels se dessine une ligne de précipitation qui rejoint celle formée entre le puits contenant l'antigène témoin positif et celui contenant le sérum du lapin hyperimmunisé sont considérés comme ayant donné un résultat positif.

Une suspension d'encéphale de souris infectées, ou des surnageants de culture cellulaires infectées peuvent être employés comme antigène pour le test de fixation du complément (FC) en vue de l'identification du virus. Ces deux antigènes ont donné des résultats satisfaisants après une purification partielle par le fluorocarbure ; l'encéphale de souris peut également être utilisé sous forme d'une suspension en tampon boraté.

Un antigène destiné à une épreuve immuno-enzymatique (ELISA) d'identification du virus peut être préparé à partir de cultures cellulaires infectées. Les cellules sont détachées avec une pipette à poire lorsque l'ECP a détruit environ 20 % du tapis cellulaire. On laisse ces cellules sédimenter, puis elles sont lavées 3 fois en tampon boraté à pH 9. Elles sont ensuite lysées et dissoutes dans du dodécyl sulfate de sodium (SDS) et 1 % de Triton X 100, diluées au 1/5 environ dans du tampon boraté, puis soumises aux ultrasons pour obtenir l'antigène nécessaire à l'ELISA. Un antigène témoin négatif est préparé de la même façon à partir d'une culture cellulaire

non infectée. Ces deux préparations sont adsorbées directement sur les plaques ELISA et l'épreuve est réalisée, avec des sérums immuns ou normaux et avec les deux antigènes.

2. Épreuves sérologiques

Elles comprennent l'inhibition de l'hémagglutination (IH), la fixation du complément (FC), la neutralisation virale (NV) et l'ELISA.

• Le virus de la Cache Valley

a) Épreuve de neutralisation virale

L'épreuve de NV pour le virus de la Vallée Cache était jadis réalisée par réduction du nombre de plages, mais elle est maintenant basée sur l'inhibition de l'ECP sur cellules Vero en plaques de microtitrage (7).

• Protocole

- i) Inactiver les sérums à éprouver pendant 30 min dans un bain Marie à 56 °C ;
- ii) Diluer les sérums de 2 en 2 dans du MEM, de 1/2 à 1/16, et les incubent 60 min à 37 °C en présence d'un égal volume de 100 DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) par ml de virus. Les témoins de référence sont préparés de la même façon ;
- iii) Rejeter le milieu surnageant d'une plaque de microtitrage pour culture cellulaire à fond plat de 96 trous (puits) dans laquelle se trouve déjà un tapis de cellules Vero de 24 h ;
- iv) Ajouter 50 µl des mélanges sérum/virus dans chaque puits de la plaque, à raison de 3 puits par dilution ;
- v) Titrer à nouveau le virus utilisé dans l'épreuve, en réalisant 3 dilutions de raison dix et en déposant 50 µl par puits, utilisant 4 puits par dilution ;
- vi) Recouvrir les plaques et les incubent 60 min supplémentaires à 37 °C ;
- vii) Ajouter 50 µl de milieu de maintenance MEM dans chaque puits ;
- viii) Incuber les plaques 6 jours à 37 °C dans un incubateur humide saturé de CO₂ ;
- ix) Lire les plaques au microscope, évaluer l'ECP et déterminer les dilutions finales neutralisantes 50 % ;
- x) Le puits témoin virus doit contenir au moins 100 DICT₅₀ non neutralisées par le sérum témoin négatif à sa plus basse dilution. Le témoin positif doit avoir un titre situé dans les limites attendues autour d'une moyenne prédéterminée.

b) Méthode immuno-enzymatique

Un ELISA modifié, inspiré de celui décrit par Meegan *et al.* pour la fièvre de la Vallée du Rift (30), a été utilisé pour les enquêtes sérologiques sur le VVC. Les modifications comprennent l'emploi d'un liquide d'ascite de souris dilué au 1/400 pour sensibiliser les plaques, suivi de celui d'un antigène à base d'encéphale de souris dilué au 1/25 en sucrose/acétone dans une épreuve sandwich ELISA. Le diluant utilisé est du PBS additionné de 0,5 % de Tween 20, de 5 % de sérum de cheval et de 500 µg de sulfate de dextran par ml. Le système de révélation de la réaction utilise un système associant un conjugué à la peroxydase de raifort et un substrat ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethyl-benzthiazoline]-6-sulphonic acid) (30).

c) Autres épreuves

Aucun des membres du groupe Bunyamwera ne possède d'hémagglutinine, mais une épreuve d'inhibition de l'hémagglutination a été décrite dans le cas du VVC, utilisant un antigène à base d'encéphale de souriceau à la mamelle en sucrose/acétone et des hématies d'oie à pH 6,2. L'épreuve est considérée comme moins sensible que la neutralisation virale, car ne détectant que 50 % des anticorps. Le test de fixation du complément est peu utilisé, compte tenu des nombreuses réactions croisées existant au sein du groupe Bunyamwera.

- **Le virus Akabane**

- a) **Épreuve d'inhibition de l'hémagglutination**

L'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination est modifiée selon Clarke & Casals 1958 (8), l'hémagglutination étant encore plus nette si on augmente la molarité du NaCl. La réussite de l'épreuve dépend aussi du pH. Les sérums sont prétraités au kaolin ou à l'acétone, puis inactivés par la chaleur durant 30 min à 56 °C. L'épreuve est réalisée en employant 4 unités d'antigène à base d'encéphales de souris extraits en sucrose/acétone, 0,3 % d'hématies et un tampon boraté à pH 9 (23).

- b) **Épreuve de neutralisation virale**

Les épreuves de neutralisation virale qui ont été décrites utilisaient des cellules HmLu-1 en tubes ou des cellules Vero ou BHK en plaques de microtitrage à fond plat de 96 trous (10, 42). Deux techniques ont été rapportées, recommandant une incubation sérum/virus de 1 h ou d'une nuit avant d'ajouter les cellules.

- **Protocole**

- i) Inactiver les sérums à éprouver 30 min au bain marie ;
- ii) Préparer des dilutions des sérums de raison deux en milieu de Eagle, du 1/2 au 1/16, dans des plaques de titrage à fond plat de 96 trous, en utilisant 2 puits par dilution, et en déposant 25 µl par puits. Les contrôles de référence sont préparés de la même façon ;
- iii) Ajouter 25 µl de virus par puits, dilué en milieu de Eagle de façon à obtenir 200 DICT₅₀ pour 50 µl ;
- iv) Couvrir les plaques et les laisser à la température de la pièce pendant 1 h ;
- v) Prévoir un nouveau titrage du virus en triplicata, en réalisant 3 dilutions de raison dix et en déposant 25 µl par puits ;
- vi) Ajouter 100 µl par puits de cellules Vero en milieu de Eagle additionné de 2 % de sérum, à raison de 5×10^5 cellules/ml ;
- vii) Incuber les plaques entre 34 et 37 °C pendant 5 jours dans un incubateur à CO₂ humidifié ;
- viii) Lire les plaques au microscope et exprimer le titre par la réciproque de la plus haute dilution du sérum capable d'inhiber tout ECP ;
- ix) Le témoin virus et le témoin sérum doivent donner les résultats attendus.

Lorsque les plaques sont incubées toute la nuit, des dilutions sériées de sérum inactivé de raison deux, réalisées en duplicata, sont mélangées à 100 DICT₅₀ de virus en déposant chaque fois 100 µl du mélange. Lorsque les plaques sont incubées 1 h à 37 °C et une nuit à 4 °C, 50 µl de cellules BHK sont ajoutés dans les plaques. La plaque est examinée après 3 et 5 jours d'incubation à 37 °C, pour déceler tout ECP éventuel.

- c) **Méthode immuno-enzymatique**

Des tests ELISA, détectant à la fois les IgG et les IgM dirigées contre le virus Akabane, ont été décrits. L'antigène tapissant les plaques est constitué par 10⁶ DICT₅₀ par ml de virus propagé sur des cellules HmLu-1 et dilué dans un tampon carbonate/bicarbonate 0,05 M à pH 9,6. Le milieu de lavage est constitué par du PBS additionné de Tween 20 et de phosphatase alcaline. On utilise des conjugués de lapin anti IgG et IgM de bovin (40).

Un test ELISA du même genre, utilisant un conjugué anti IgG de lapin anti-bovin couplé à une peroxydase de raifort a été également décrit.

Un test ELISA de compétition ayant une spécificité de 98 % a aussi été mis au point (39).

- d) **Test de fixation du complément**

Le test de fixation du complément n'est pas décrit ici car il s'agit d'une épreuve spécifique de groupe qui n'est plus que rarement utilisée.

- **La maladie du mouton de Nairobi**

- a) **Épreuve d'immunofluorescence indirecte**

L'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) est la plus indiquée pour étudier les membres du groupe des Nairovirus. Toutefois, elle n'est pas exempte de quelques réactions croisées, en particulier avec le virus Dugbe et avec d'autres membres du même groupe tel que le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (13). Lorsqu'ils sont déterminés par cette méthode, les titres d'anticorps dirigés contre le virus de la MMN vont de 1/640 à 1/10 240, alors que de tels titres ne sont pas atteints avec des sérums dont les anticorps sont dirigés contre d'autres membres du groupe (14).

La méthode a été utilisée pour des enquêtes sérologiques et pour mesurer l'immunité induite par des vaccinations expérimentales. Il semble n'y avoir aucune différence, au plan sérologique, entre les 40 à 50 isolats étudiés. D'habitude, c'est la souche I-34² qui est utilisée pour préparer l'antigène viral, et le virus a été adapté à la culture sur cellules BHK-21-C13 par des passages en série.

L'antigène viral utilisé pour l'épreuve peut être associé à des cellules appropriées propagées sur de simples lames couvre-objets, des lames multi-puits, des lames couvertes de téflon ou des plaques de microtitrage. Une méthode utilisant des lames couvertes de téflon a été décrite.

- **Préparation des lames d'antigène**

- i) Laver et stériliser les lames couvertes de téflon. Ceci peut être fait rapidement avec le détergent chaud utilisé pour la vaisselle de laboratoire ; rincer ensuite 3 fois 30 min à l'eau du robinet, chaque rinçage étant suivi d'autres rinçages de même durée en eau distillée/déionisée. Les lames sont ensuite plongées 10 min dans l'alcool à 70 %, dont elles sont sorties avec des pinces stériles et enveloppées dans du papier sulfurisé. Elles sont stériles, mais une stérilisation supplémentaire par micro-ondes, en 2 cycles de 5 min, est recommandée ;
- ii) Placer ces lames dans des boîtes stériles avec une pince stérile : une boîte en polystyrène carrée fera mieux l'affaire qu'une boîte ronde ;
- iii) Mélanger une suspension d'environ 25 000 cellules BHK par ml dans un milieu de culture (généralement du milieu de Eagle pour BHK), et ajouter 1 000 DICT₅₀ par ml de la souche MMN I-34. Mélanger par pipetage. Préparer quelques lames témoins négatives non infectées ;
- iv) Ajouter les cellules infectées sous un volume de 50 µl (pour les plaques à 12 trous) ou sous un volume correspondant à la taille des puits en téflon. Remettre le couvercle des boîtes et les placer dans une enceinte à CO₂ humidifiée ou dans une jarre anaérobie ;
- v) Laisser le tapis cellulaire se former dans la nuit. Sortir ensuite les plaques de l'incubateur et, sous hotte à flux laminaire, les recouvrir complètement d'une épaisseur de 2 à 3 mm de milieu de maintenance avec une pipette, puis les remettre dans l'incubateur ;
- vi) Récolter l'antigène dès que les premiers foyers d'ECP se manifestent sur les lames. C'est généralement après 36 à 56 h de culture, mais on peut déterminer de façon plus précise le meilleur moment de la récolte en colorant une lame après 24, 36 et 48 h ;
- vii) Les lames sont lavées 3 fois en PBS, puis séchées. Elles sont ensuite fixées par la chaleur sèche (à 80 °C au minimum) ou par l'acétone glacé pendant 10 min. Les lames sont enveloppées, et peuvent être ainsi conservées à 4 °C pendant 2 à 3 mois, ou à -20 °C pendant 1 à 2 ans. Les lames conservées à -20 °C doivent être d'abord ramenées à 4 °C pendant une nuit avant d'être utilisées.

Des méthodes similaires peuvent être mises en œuvre pour préparer des antigènes sur des lamelles couvre-objet ou des lames de cultures multi-puits. Toutefois, lorsqu'on utilise des plaques de culture Nunc multi-puits, elles doivent être fixées à l'acétone à 75 %.

- **Protocole**

- i) Hydrater les lames en déposant une goutte de PBS dans les puits avec une pipette Pasteur. Reporter sur les lames les numéros des sérums à analyser. Introduire, dans la série à analyser, des sérums témoins positifs et négatifs avec des cultures cellulaires infectées et non infectées ;
- ii) Rejeter le PBS et ajouter les sérums dilués 1/80 au 1/2 560 dans les puits 1 à 6 selon un schéma prédéterminé. Il vaut mieux titrer chaque dilution 2 fois, du même côté ;
- iii) Placer les lames dans les boîtes qui seront maintenues en chambre humide à 37 °C pendant 40 min ;

2 La souche I-34 est un isolat virulent de MMN obtenu au Kenya, très utilisé comme souche de référence au Kabete Laboratory – Kenya Agriculture Research Institute, P.O. Box 58137, Kabete, Nairobi, Kenya.

- iv) Placer les lames dans des paniers et les laver 5 min dans 3 bains successifs de PBS ;
- v) Ajouter le conjugué fluorescent anti-espèces (généralement un conjugué anti-ovin ou anti-caprin), à une dilution de travail prédéterminée ; on peut rajouter une goutte par puits, à la pipette Pasteur ou autre ;
- vi) Incuber, comme précédemment, pendant 30 min ;
- vii) Laver 3 fois en PBS et sécher les lames ;
- viii) Examiner les lames au microscope à immunofluorescence. L'antigène du virus MMN se trouve dans le cytoplasme cellulaire, et on apercevra des foyers fusiformes de cellules BHK fluorescentes. L'antigène apparaît surtout sous forme de petites particules fluorescentes, mais aussi sous forme d'amas plus importants et de forme irrégulière, qui entourent souvent le nucléus, ou sous forme de masses fusiformes emplissant le cytoplasme aux pôles de la cellule. Ces particules n'apparaissent pas avec les sérums témoins négatifs, ni dans les cultures témoins non inoculées ;
- ix) Les sérums pour lesquels une fluorescence est visible aux dilutions 1/640 à 1/1280 sont ceux d'animaux victimes d'une infection récente par le virus de la MMN (14).

b) Autres épreuves

L'épreuve de fixation du complément est compliquée du fait du pouvoir anti-complémentaire marqué de nombreux sérums ovins.

Les épreuves d'immunodiffusion ont été utilisées avec succès en employant des antigènes bruts préparés à partir d'organes de mouton, de surnageants de cultures cellulaires ou d'encéphales de souris infectés. Pour cette épreuve, des sérums hyperimmuns peuvent être préparés sur mouton, souris ou lapin en utilisant la rate infectée de moutons mourants de MMN comme antigène immunisant.

Un ELISA utilisant un antigène de culture cellulaire partiellement purifié a été proposé pour la recherche des anticorps, et il convient bien aux enquêtes sérologiques. Toutefois, en cas de résultats douteux, il faut faire appel à un test d'immunofluorescence indirecte (32).

Des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de la souche I-34 du virus de la MMN ont été préparés, et ils sont en cours d'évaluation comme réactifs diagnostics.

Des sondes ARN ont été également préparées à partir des petits (S) et moyens (M) segments génomiques du virus Dugbe, et elles ont été utilisées pour démontrer que le sérotype MMN du genre Nairovirus était plus étroitement apparenté au sérotype de la fièvre hémorragique Crimée-Congo qu'à n'importe quel autre sérotype (29, 41). Ces sondes pourraient être employées comme outils diagnostics.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

• Le virus de la Cache Valley

Du fait de la nature sporadique des infections qu'il entraîne, aucun vaccin n'a été préparé contre le virus de la Cache Valley.

• Le virus Akabane

Des épidémies importantes de la maladie d'Akabane n'ont été signalées qu'au Japon et en Australie, et à intervalles irréguliers, mais la vaccination y est considérée comme utile pour éviter les avortements.

Des vaccins ont été produits au Japon et en Australie, et ils sont utilisés au niveau national.

Un vaccin à virus inactivé est utilisé au Japon pour immuniser les bovins et les caprins par voie intramusculaire. Il s'agit d'un vaccin à virus inactivé par le formol et additionné d'un adjuvant à base de gel de phosphate d'aluminium. Deux doses de 3 ml sont administrées à 4 semaines d'intervalle, et des rappels annuels sont recommandés. Ce vaccin est sans danger pour les femelles gestantes. Lors d'essais sur le terrain 88 % des animaux ont développé des titres élevés d'anticorps neutralisants après une première injection de vaccin, et 100 % après une seconde dose (27). De même, en Australie, un vaccin à virus inactivé a été préparé pour utilisation par voie intramusculaire, à raison de 2 doses administrées à 4 semaines d'intervalle, juste avant la reproduction.

Au Japon, un vaccin à virus vivant est commercialisé. Une dose de 1 ml est administrée par voie sous-cutanée aux bovins avant que les arthropodes vecteurs hématophages ne deviennent actifs. Des vaches gestantes et des veaux ont été inoculés avec ce virus par voies sous-cutanée, intramusculaire et intracérébrale ; on a observé ni leucopénie, ni virémie, ni hyperthermie mais une bonne production d'anticorps neutralisants. Un virus vaccin vivant de la maladie d'Akabane, inoffensif pour les bovins, a été essayé chez les brebis. Durant cet essai, quelques brebis ont présenté une virémie et le virus a été retrouvé dans les organes de plusieurs de leurs fœtus. Bien qu'aucune anomalie fœtale n'ait été observée, ce vaccin n'a pas été considéré comme utilisable chez les ovins.

- **La maladie du mouton de Nairobi**

Les recherches épidémiologiques ont montré que, lorsque l'enzootie de MMN est stabilisée, la maladie ne pose plus de problèmes. La maladie résulte des mouvements d'animaux se déplaçant de zones indemnes de MMN vers des zones d'enzootie, et elle peut donc être évitée lorsqu'on a identifié ces dernières. Les changements écologiques qui permettent à la tique vectrice d'étendre son aire de répartition ont pour conséquence une extension de ces zones d'enzootie.

Des vaccins expérimentaux ont été préparés pour faire face à ces situations. L'un de ces vaccins était un virus atténué par 35 passages sur souris adultes, mais ces types de vaccin pouvant entraîner des réactions sévères chez certaines races ovines, ils ne sont pas considérés comme assez sûrs pour que leur emploi puisse être généralisé. Un vaccin du même genre a été développé à Entebbe, en effectuant d'autres passages intracérébraux, sur souris, mais il n'a été utilisé sur le terrain ni en Ouganda ni ailleurs.

Une souche de MMN, adaptée et propagée sur des cellules cultivées en tubes roulants, a produit des titres élevés de virus. Après précipitation par le méthanol, inactivation et addition d'un adjuvant de l'immunité ce virus s'est avéré bien protéger contre l'infection après deux injections pratiquées à 14 jours d'intervalle. Aucun de ces vaccins n'est produit en routine, car il y a eu peu de demandes d'utilisation sur le terrain (15, 17).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AKASHI H., ONUMA S., NAGANO H., OHTA M. & FUKUTOMI T. (1999). Detection and differentiation of Aino and Akabane Simbu serogroup bunyaviruses by nested polymerase chain reaction. *Arch. Virol.*, **144**, 2101–2109.
2. BLACKMORE C.G. & GRIMSTAD P.R. (1998). Cache Valley and Potosi viruses (Bunyaviridae) in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) experimental infections and antibody prevalence in natural populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **59**, 704–709.
3. BLACKSELL S.D., LUNT R.A. & WHITE J.R. (1997). Rapid identification of Australian bunyavirus isolates belonging to the Simbu serogroup using indirect ELISA formats. *J. Virol. Methods*, **66**, 123–133.
4. CALISHER C.H., FRANCY D.B., SMITH G.C., MUTH D.J., LAZUICK T.S., KARABATSOS N., JAKOB W.L. & MCLEAN R.G. (1986). Distribution of Bunyamwera serogroup viruses in North America, 1956–1984. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**, 429–443.
5. CAMPBELL G., MATA CZYNSKI J.D., REISDORF E.S., POWELL J.W., MARTIN D.A., LAMBERT A.J., HAUPT T.E., DAVIS J.P. & LANCIOTTI R.S. (2006). Second human case of Cache Valley virus disease. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**, 854–856.
6. CHUNG S.I., LIVINGSTON C.W. JR, EDWARDS J.F., CRANDELL R.W., SHOPE R.E., SHELTON M.J. & COLLISON E.W. (1990). Evidence that Cache Valley virus induces congenital malformations in sheep. *Vet. Microbiol.*, **21**, 297–307.
7. CHUNG S.I., LIVINGSTON C.W. JR, EDWARDS J.F., GAUER B.B. & COLLISON E.W. (1990). Congenital malformations in sheep resulting from *in utero* inoculation of Cache Valley virus. *Am. J. Vet. Res.*, **51**, 1645–1648.
8. CLARKE D.H. & CASALS J. (1958). Techniques for hemagglutination and haemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **7**, 561–573.
9. CRANDELL R.A., LIVINGSTON C.W. JR & SHELTON M.J. (1989). Laboratory investigation of a naturally occurring outbreak of arthrogryposis-hydrancephaly in Texas sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **1**, 62–65.

10. DA COSTA MENDES V.M. (1984) The isolation and importance of Simbu group viruses in South Africa. Thesis for M. Med. Vet (Vir.) University of Pretoria, South Africa.
11. DAVIES F.G. (1988). Nairobi sheep disease. *In: The Ecology of Arboviruses*, Vol. 3, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 191–203.
12. DAVIES F.G. (1997). Nairobi sheep disease. *Parasitologia*, **39**, 95–98.
13. DAVIES F.G., CASALS J., JESSETT D.M. & OCHIENG P. (1978). The serological relationships of Nairobi sheep disease virus. *J. Comp. Pathol.*, **88**, 519–523.
14. DAVIES F.G., JESSETT D.M. & OTIENO S. (1976). The antibody response of sheep following infection with Nairobi sheep disease virus. *J. Comp. Pathol.*, **86**, 497–502.
15. DAVIES F.G., MUNGAJ J. & SHAW T. (1974). A Nairobi sheep disease vaccine. *Vet. Rec.*, **94**, 128.
16. DAVIES F.G., MUNGAJ J. & TAYLOR M. (1977). The laboratory diagnosis of Nairobi sheep disease. *Trop. Anim. Health Prod.*, **9**, 75–80.
17. DAVIES F.G., OTIENO S. & JESSETT D.M. (1977). The antibody response in sheep vaccinated with experimental Nairobi sheep disease vaccines. *Trop. Anim. Health Prod.*, **9**, 181–183.
18. EDWARDS J.F., KARABATSOS N., COLLISON E.W. & DE LA CONCHA BERMEJILLO A. (1997). Ovine fetal malformations induced by *in utero* inoculation with Main Drain, San Angelo and LaCrosse viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **56**, 171–176.
19. FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANIHOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (EDS) (2005). Bunyviridae family. *In: 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, 1162 pp. Elsevier Publication Date: 27 May 2005, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>.
20. HOLDEN P. & HESS A.D. (1959). Cache Valley Virus, a previously undescribed mosquito-borne agent. *Science*, **130**, 1187–1188.
21. HUANG C., SLATER B., CAMPBELL W., HOWARD J. & WHITE D. (2001). Detection of arboviral RNA directly from mosquito homogenates by reverse-transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **94**, 121–128.
22. GARD G.P., WEIR R.P. & WALSH S.J. (1988). Arboviruses recovered from sentinel cattle using several virus isolation methods. *Vet. Microbiol.*, **18** (2), 119–125.
23. GOTO Y., INABA Y., MIURA Y., KUROGI H., TAKAHASHI E., SATO K., OMORI T., HANAKI T., SAZAWA H. & MATUMOTO M. (1978). Hamagglutination-inhibition test applied to the study of Akabane virus infection in domestic animals. *Vet. Microbiol.*, **3**, 89–99.
24. KARABATSOS N. (ED.) (1985). International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates, Third Edition. American Society for Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, Texas, USA.
25. KIRKLAND P.D., BARRY R.D., HARPER P.A. & ZELSKI R.Z. (1988). The development of Akabane virus-induced congenital abnormalities in cattle. *Vet. Rec.*, **122**, 582–586.
26. KUNO G., MITCHELL C.J., CHANG G.J. & SMITH E.C. (1996). Detecting Bunyaviruses of the Bunyamwera and California serogroups by a PCR technique. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 1184–1188.
27. KUROGI H., INABA Y., TAKAHASHI E., SATO K., GOTO Y., SATODA K. & OMORI T. (1978). Development of inactivated vaccine for Akabane disease. *Natl Inst. Anim. Health Q.*, **18**, 97–108.
28. LEE J.K., PARK J.S., CHOI J.H., PARK B.K., LEE B.C., HWANG W.S., KIM J.H., JEAN Y.H., HARITANI M., YOO H.S. & KIM D.Y. (2002). Encephalomyelitis associated with akabane virus infection in adult cows. *Vet. Pathol.*, **39**(2), 269–273.
29. MARRIOTT A.C., WARD V.K., HIGGS S. & NUTTALL P.A. (1990). RNA probes detect nucleotide sequence homology between members of two different nairovirus serogroups. *Virus Res.*, **16**, 77–81.

30. MEEGAN J.M., YEDLOUTSCHNIG R.J., PELEG B.A., SHY J., PETERS C.J., WALKER J.S. & SHOPE R.E. (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to RVF virus in ovine and bovine sera. *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 1138–1141.
31. MORELI M.L., AQUINO V.H. & FIGUEIREDO L.T. (2001). Identification of Simbu, California and Bunyamwera serogroup bunyaviruses by nested RT-PCR. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **95**, 108–113.
32. MUNZ E., REIMANN M., FRITZ T. & MEIER K. (1984). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to Nairobi sheep disease virus in comparison with an indirect immunofluorescent and haemagglutination test. II. Results observed with sera of experimentally infected rabbits and sheep and with African sheep sera. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **31**, 537–549.
33. NODA Y., YOKOYAMA H., KATSUKI T., KURASHIGE S., UCHINUNO Y. & NARITA M. (2001). Demonstration of Akabane virus antigen using immunohistochemistry in naturally infected newborn calves. *Vet. Pathol.*, **38**, 216–218.
34. PARSONSON I.M., DELLA-PORTA A.J. & SNOWDON W.A. (1975). Congenital abnormalities in newborn lambs after infection of pregnant sheep with Akabane virus. *Infect. Immun.*, **15**, 254–262.
35. SAHU S.P., PEDERSEN D.D., RIDPATH H.D., OSTLUND E.N., SCHMITT B.J. & ALSTAD D.A. (2002). Serologic survey of cattle in the northeastern and north central United States, Virginia, Alaska, and Hawaii for antibodies to Cache Valley and antigenically related viruses (Bunyamwera serogroup virus). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **67**(1), 119–122.
36. SEXTON D.J., ROLLIN P.E., BREITSCHWERDT E.B., COREY G.R., MYERS S.A., DUMAIS M.R., BOWEN M.D., GOLDSMITH C.S., ZAKI S.R., NICHOL S.T., PETERS C.J. & KSIAZEK T.G. (1997). Life-threatening Cache Valley virus infection. *N. Engl. J. Med.*, **336**, 547–549.
37. SHEPHERD N.C., GEE C.D., JESSEP T., TIMMINS G., CARROLL S.N. & BONNER R.B. (1978). Congenital bovine epizootic arthrogryposis and hydranencephaly. *Aust. Vet. J.*, **54**, 171–177.
38. STRAM Y., KUZNETZOVA L., GUINI M., ROGEL A., MEIROM R., CHAI D., YADIN H. & BRENNER J. (2004). Detection and quantitation of akabane and aino viruses by multiplex real-time reverse-transcriptase PCR. *J. Virol. Methods*, **116**, 147–154.
39. TSUDA T., YOSHIDA K., YANASE T., OHASHI S. & YAMAKAWA M. (2004). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the antibodies specific to akabane virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **16**(6), 571–576.
40. UNGAR-WARON H., GLUCKMAN A. & TRAININ Z. (1989). ELISA test for the serodiagnosis of Akabane virus infection in cattle. *Trop. Anim. Health Prod.*, **21**, 205–210.
41. WARD V.K., MARRIOTT A.C., POLYZONI T., EL GHORR A.A., ANTONIADIS A. & NUTTALL P.A. (1992). Expression of the nucleocapsid protein of Dugbe virus and antigenic cross-reactions with other nairoviruses. *Virus Res.*, **24**, 223–229.
42. WEIR R.P. (2003). Aino virus. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures, Sub-committee on Animal Health Laboratory Standards Available from <http://www.scahls.org.au/>.
43. ZELLER H. & BOULOY M. (2000). Infections by viruses of the families Bunyaviridae and Filoviridae. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **19**, 79–91.

*
* *

VARIOLE DES CAMÉLIDÉS

RÉSUMÉ

La variole des camélidés est une maladie infectieuse et virale largement répandue chez les camélidés de l'Ancien Monde. Ceux du Nouveau Monde y sont également réceptifs. La maladie est présente dans toute la zone d'élevage des camélidés d'Afrique au nord de l'équateur, au Moyen-Orient et en Asie, où ses conséquences économiques sont liées à des pertes de production et parfois à la mort des animaux. Le virus de la variole des camélidés appartient à la famille des Poxviridae, sous-famille des Chordopoxvirinae, genre Orthopoxvirus. La maladie se caractérise par de la fièvre, une éruption locale ou généralisée de papules varioliques (« pox ») localisées sur la peau ainsi que sur les muqueuses de la bouche et des appareils digestif et respiratoire. Les signes cliniques peuvent être soit inapparents soit ceux d'une infection légère ou modérée et, plus rarement, ceux d'une infection grave, généralisée et mortelle. La maladie est plus fréquente et plus sévère chez les jeunes animaux. La maladie se transmet soit par contact direct entre animaux infectés et réceptifs soit indirectement en milieu infecté. Les insectes pourraient jouer un rôle dans cette transmission car la maladie apparaît souvent après les pluies. Le virus de la variole des camélidés est très spécifiquement lié à son hôte, et n'infecte pas d'autres animaux. Un seul cas de transmission à l'homme a été suspecté, qui s'est traduit par des lésions cutanées discrètes, ce qui prouve que la variole des camélidés n'est pas un problème de santé publique d'importance.

Identification de l'agent pathogène : *le diagnostic présomptif de la variole des camélidés se fonde sur l'examen clinique. Toutefois, le diagnostic différentiel de l'affection débutante et des cas bénins de la maladie s'impose avec l'ecthyma contagieux (« orf »), les infections à papillomavirus et les réactions aux piqures d'insectes. Il existe plusieurs autres méthodes de diagnostic et, chaque fois que cela est possible, il faut recourir à plusieurs d'entre elles pour confirmer la maladie.*

La méthode de laboratoire la plus rapide pour confirmer un cas de variole des camélidés consiste à apercevoir la forme caractéristique en brique des virions de l'orthopox au microscope électronique en transmission (MET), dans les lésions cutanées, dans les croûtes ou dans les prélèvements tissulaires. Le virus de la variole des camélidés se distingue du virus parapox ovoïde, qui est l'agent causal de la principale maladie avec laquelle elle ne doit pas être confondue : l'ecthyma contagieux des camélidés. Toutefois, les deux virus peuvent être aperçus en même temps par MET, car il a été rapporté que les deux infections peuvent coexister.

Le diagnostic de variole des camélidés peut être confirmé par la détection immunochimique de l'antigène viral dans les croûtes et les lésions tissulaires. C'est une méthode relativement simple réalisable dans les laboratoires ne disposant pas de MET. En outre, les prélèvements en blocs de paraffine peuvent être conservés très longtemps ce qui permettra plus tard des études épidémiologiques rétrospectives.

Le virus de la variole des camélidés peut se répliquer sur membrane chorio-allantoïdienne (MCA) d'œuf de poule embryonné. Cinq jours plus tard, des lésions caractéristiques peuvent être observées sur la MCA. Le virus de la variole des camélidés est cytopathogène pour nombre de cultures cellulaires. Les corps d'inclusion intracytoplasmiques et éosinophiles caractéristiques des infections varioliques peuvent être observés dans les cellules infectées après coloration à l'hématoxyline-éosine. La présence de l'acide nucléique viral peut être confirmée par la réaction d'amplification en chaîne par polymérase, et les différentes souches de virus peuvent être identifiées par l'analyse de restriction enzymatique de l'ADN. Il existe une épreuve immuno-enzymatique (ELISA) par capture de l'antigène du virus de la variole des camélidés.

Épreuves sérologiques : il existe de nombreuses épreuves sérologiques permettant de détecter la variole des camélidés. Les épreuves utilisées pour détecter les anticorps dirigés contre le virus de la variole des camélidés sont la neutralisation virale, la précipitation en gel, l'hémagglutination, l'inhibition de l'hémagglutination, la fixation du complément, les anticorps fluorescents et la méthode immuno-enzymatique ELISA de capture de l'anticorps.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : il existe dans le commerce des vaccins à virus atténués et inactivés contre la variole des camélidés. Les vaccins vivant de virulence atténuée protègent au moins 6 ans, et les vaccins à virus inactivés protègent 12 mois. Il n'y a pas d'exigences normalisées pour les vaccins et les produits de diagnostic biologiques.

A. INTRODUCTION

La variole des camélidés existe dans presque tous les pays où sont élevés des camélidés, à l'exception de l'Australie (pour les dromadaires importés) et de l'Amérique du sud avec les tylopodes (lamas et espèces apparentées). Des foyers de la maladie ont été signalés au Moyen-Orient (Arabie Saoudite, Bahreïn, Émirats Arabes Unis, Iran, Irak, Oman et Yémen), en Asie (Afghanistan et Pakistan), en Afrique (Algérie, Égypte, Éthiopie, Kenya, Maroc, Mauritanie, Niger, Somalie et Soudan) (9, 18) ainsi que dans le sud de la Russie et de l'Inde. La maladie est enzootique dans ces pays et des cas sporadiques saisonniers plus nombreux peuvent être observés, notamment durant la période des pluies.

La variole des camélidés est due au virus *Orthopoxvirus cameli*, qui appartient au genre *Orthopoxvirus* et à la famille des *Poxviridae*. Le séquençage de son génome a permis de constater que ce virus est le plus proche virus apparenté de l'agent causal de la variole humaine, le virus variolique. Les camélidés ont pu être vaccinés avec succès contre la variole des camélidés avec du virus variolique humain. La taille moyenne du virion est de 265 à 295 nm. Les orthopoxvirus sont des virus enveloppés, en forme de brique, dont la membrane externe est recouverte de protéines tubulaires arrangées de façon irrégulière. Un virion comporte une enveloppe, une membrane externe, deux corps latéraux et un noyau (« core »). L'acide nucléique est un ADN double-brin. Le virus se réplique dans le cytoplasme de la cellule hôte, dans ce que l'on appelle les corps d'inclusion. Les virus de la variole des camélidés agglutinent les hématies de poulet. Toutefois, cette hémagglutination peut être faible (4). Le virus résiste à l'éther, mais il est sensible au chloroforme (4, 15). Il est sensible de pH 3 à pH 5 et de pH 8,5 à pH 10 (4). Les poxvirus sont sensibles à différents désinfectants, notamment l'hypochlorite et l'hydroxyde de sodium à 1 %, l'acide peracétique à 1 %, le formaldéhyde, le formol du commerce à 0,5-1 % et les ammoniums quaternaires à 0,5 %. Le virus de la variole des camélidés peut être détruit par autoclavage, ou par ébullition pendant 10 min, et il est inactivé en quelques minutes par exposition aux rayons ultra-violets (245 nm) (3).

La période d'incubation de la variole des camélidés est en moyenne de 9 à 13 jours (extrêmes de 3 à 15 jours). Cliniquement, et sans doute en fonction des souches de virus en cause (16), elle peut soit passer inaperçue ou se manifester par une infection localisée et bénigne de la peau, soit se traduire par une infection généralisée, modérée ou grave. La maladie se caractérise par de la fièvre, un engorgement des nœuds lymphatique et des lésions cutanées. Ces dernières apparaissent de 1 à 3 jours après la fièvre, débutant par des macules érythémateuses qui se transforment en papules et vésicules puis en pustules. Les croûtes se développent à partir des pustules déchirées. Les lésions sont d'abord observées au niveau de la tête, des paupières, des naseaux et au bord des oreilles. Dans les cas graves toute la tête peut être enflée. Plus tard, les lésions cutanées peuvent gagner l'encolure, les membres postérieurs, les organes génitaux, la mamelle et le périnée. Dans la forme généralisée, les lésions cutanées peuvent envahir la totalité du corps. Ces lésions peuvent mettre de 4 à 6 semaines à guérir. Dans la forme généralisée de la maladie, des lésions varioliques peuvent se développer sur les muqueuses de la bouche, de l'appareil respiratoire et de l'appareil digestif (7, 16).

Les animaux peuvent montrer une salivation, un larmolement et une décharge nasale muco-purulente. Diarrhée et anorexie peuvent apparaître dans la forme généralisée de la maladie. Les femelles gestantes peuvent avorter. La mort est habituellement la conséquence d'infections secondaires ou d'une sépticémie (16).

L'examen histologique des premiers nodules cutanés révèle une enflure caractéristique du cytoplasme ainsi qu'une vacuolisation et un ballonnement des kératinocytes du *stratum spinosum* externe. La rupture de ces cellules entraîne la production de vésicules et d'un œdème local. Il se produit une infiltration périvasculaire des cellules mononuclées et parfois des polynucléaires neutrophiles et des éosinophiles. Une importante hyperplasie épithéliale peut également être observée au bord des lésions cutanées (20).

Rares sont les descriptions anatomopathologiques précises des lésions internes de la variole des camélidés. À l'autopsie d'animaux ayant succombé à des formes graves de variole des camélidés, on peut observer de multiples lésions varioliformes sur les muqueuses de la bouche, de l'appareil respiratoire et de l'appareil digestif.

Le diamètre des lésions pulmonaires varie de 0,5 à 1,3 cm, pouvant parfois atteindre 4 à 5 cm. Le centre des lésions les plus petites peut être hémorragique. Ces lésions pulmonaires sont caractérisées par une dégénérescence hydropique, une prolifération des cellules épithéliales bronchiques et une infiltration des zones intéressées par les macrophages, par la nécrose et par la fibrose (6, 13, 17).

Le taux de morbidité de la variole des camélidés dépend du taux de circulation du virus au sein du troupeau. Les enquêtes sérologiques réalisées dans plusieurs pays ont révélé une importante prévalence des anticorps contre le virus causal (16). L'incidence de la maladie est plus élevée chez les mâles que chez les femelles, et le taux de mortalité plus important chez les jeunes que chez les adultes (7). Le taux de mortalité observé chez les adultes se situe entre 5 % et 28 %, contre 25 % à 100 % chez les jeunes (9).

La variole des camélidés se transmet soit par contact direct entre animaux infectés et réceptifs, soit indirectement dans un environnement contaminé. L'infection se produit généralement par inhalation ou pénétration du virus à travers une brèche cutanée. Le virus se retrouve dans le lait, la salive et les sécrétions oculaires et nasales. Les croûtes desséchées des lésions varioliques peuvent contenir des virus vivants pendant au moins quatre mois et contaminer l'environnement. Un arthropode vecteur a été soupçonné de transmettre la maladie. Le virus de la variole des camélidés a été observé en microscopie électronique (MET) dans des tiques des camélidés, *Hyalomma dromedarii*, récoltées sur des animaux infectés, et le virus a été également isolé de ces tiques. Le nombre accru de tiques en saison des pluies peut être responsable de la diffusion de la maladie (17). Cependant, d'autres vecteurs pourraient être incriminés, notamment les mouches piqueuses et les moustiques.

Certains ont suggéré que les différentes souches du virus de la variole des camélidés pourraient ne pas présenter la même virulence (16). L'analyse par restriction enzymatique de l'ADN viral permet de comparer les isolats, mais aucune différence importante avec la souche vaccinale n'a pu encore être démontrée (17).

L'immunité vis-à-vis de la variole des camélidés est à médiation à la fois humorale et cellulaire. L'importance respective de ces deux mécanismes n'est pas totalement élucidée, mais certains pensent que les anticorps circulants ne reflètent pas le statut immunitaire de l'animal (16). L'infection naturelle entraîne une immunité à vie. Les vaccins à virus atténué protègent de la maladie pendant au moins six mois et sans doute plus (19). Les vaccins à virus inactivé ne protègent qu'une année.

Le virus de la variole des camélidés présente une étroite spécificité d'hôte et n'infecte donc pas les autres animaux, notamment les bovins, les ovins et les caprins. Sur le terrain, des lésions bénignes associées à la variole des camélidés ont été observées chez l'homme (3), mais un seul cas suspect aurait été avéré (7) ce qui confirme que la variole des camélidés n'est pas un problème de santé publique.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Au cours du stade virémique de la maladie (première semaine après l'apparition des symptômes) le virus de la variole des camélidés peut être isolé en cultures cellulaires à partir du sang hépariné, ou l'ADN viral peut être détecté grâce à l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) à partir du sang recueilli sur EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique). Le sang doit être prélevé stérilement par ponction veineuse. Le sang prélevé sur anticoagulant pour isolement du virus à partir de la couche leucocyto-plaquettaire doit être placé aussitôt sous glace et traité dès que possible. En pratique, les prélèvements peuvent être conservés jusqu'à 2 jours à 4 °C avant analyse, mais ne doivent pas être congelés ni abandonnés à température ambiante.

Le sang destiné à la récolte de sérum doit être recueilli dans des tubes normaux, sans anticoagulant. Ces tubes doivent reposer 1 à 2 h à la température de la pièce jusqu'à ce que le caillot commence à se rétracter, puis le sang est centrifugé à 1 000 *g* pendant 10 à 15 min. Le sérum surnageant peut être prélevé à la pipette et gardé quelque temps à 4 °C ou conservé à -20 °C.

Pour l'isolement du virus et l'histopathologie, il faut prélever au moins 2 g de biopsie cutanée et d'organes. Pour la PCR, 30 à 50 mg de tissus seront placés dans un tube à congélation ou équivalent, maintenus à 4 °C pendant le transport puis conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse. Les prélèvements de tissus destinés à l'isolement du virus seront placés dans un milieu de transport tel que le bouillon tryptose tri-tamponné, maintenu à 4 °C pendant le transport puis conservé à -80 °C jusqu'à l'analyse. Pour l'examen histologique, les prélèvements seront aussitôt plongés dans dix fois leur volume de formol à 10 %. La taille du prélèvement ne doit pas excéder 0,5 × 1-2 cm. Ces prélèvements peuvent être transportés à température ambiante.

1. Identification de l'agent pathogène

a) Microscopie électronique en transmission

La MET est une méthode rapide de détection du virus de la variole des camélidés à partir des croûtes ou des prélèvements de tissus. Toutefois, elle requiert une assez forte concentration de virus pour permettre un diagnostic et le virus de la variole des camélidés ne peut pas être distingué des autres virus orthopox par cette technique. Mais la MET reste aujourd'hui la meilleure méthode pour établir une différence entre les cas cliniques de variole des camélidés et les cas d'ecthyma contagieux, dus au virus parapox, même si ces deux virus peuvent être distingués par des techniques sérologiques et par PCR (9).

Le prélèvement doit peser au moins 30 à 50 mg. Les croûtes ou les fragments d'organes seront découpés en petits morceaux avec un bistouri à usage unique ou avec des ciseaux et une pince stérile. Broyer ces morceaux dans un mortier, avec du sable stérile et cinq fois leur volume d'une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) additionnée d'antibiotiques (par exemple 10^5 unités internationales de pénicilline et 10 mg de streptomycine par ml). Transférer ce broyat dans un tube à centrifuger et le congeler-décongeler deux ou trois fois pour faire sortir le virus des cellules, en le plaçant sur un mélangeur de réactifs (vortex) lors de la décongélation. Placer le tube sur de la glace et le soumettre 30 s aux ultrasons à 80 Hz. Centrifuger 10 min à 1 000 **g** pour éliminer les grosses particules, et récolter le surnageant (12, 14).

- **Méthode d'examen**

Placer 10 µl du surnageant récolté sur des grilles couvertes de poly-L-lysine et incubé 5 min à la température de la pièce. Eponger le liquide avec un papier filtre à chromatographie. Ajouter à la grille une goutte d'acide phosphotungstique à 2 % (dilué dans de l'eau stérile et ajusté à pH 7,2 avec de la soude), incubé 5 min à la température de la pièce et sécher à l'air. Examiner la grille au MET (12, 14).

Le virus de la variole des camélidés a un aspect typique en brique, avec des protéines de surface agencées de façon irrégulière. Les virus parapox sont légèrement plus petits, ovoïdes et avec des protéines de surface agencées de façon régulière.

b) Isolement du virus en cultures cellulaires

Le virus de la variole des camélidés peut se multiplier dans de nombreux systèmes cellulaires, y compris les cellules de lignée suivantes : Vero, MA-104, rein de singe MS et rein de hamster nouveau-né (BHK), ainsi que dans les cellules de première explantation de testicules ou de reins d'agneau, de rein fœtal de chameau, de rein de veau et de fibroblastes de poulet (4, 15).

Les échantillons sont préparés en vue de l'isolement du virus en suivant le processus décrit plus haut dans le paragraphe B.1.a.

- **Protocole**

Incuber 400 µl de surnageant pendant 1 h à la température de la pièce puis toute la nuit à 4 °C. Faire passer le surnageant sur un filtre de 0,45 µm et inoculer dans un flacon couvert d'un tapis cellulaire confluent de 25 cm². Rincer le filtre avec 0,5 ml de milieu d'entretien pour culture cellulaire et incubé les flacons 1 h à 37 °C. Ajouter 6 à 7 ml de milieu neuf dans le flacon et poursuivre l'incubation 10 jours environ. En cas de suspicion de contamination fongique, le milieu contaminé doit être rejeté et remplacé par du milieu neuf contenant 5 µg/ml d'amphotéricine B. Les flacons doivent être observés quotidiennement pendant 10 à 12 jours.

En cas de présence du virus, les plages caractéristiques d'un effet cytopathogène (ECP) peuvent apparaître dès la 24^e heure après l'inoculation, accompagnées de la formation d'amas de cellules rondes, de cellules géantes et de syncytia. Ces derniers peuvent posséder jusqu'à 25 noyaux (15). La présence du virus de la variole des camélidés dans la culture cellulaire peut être confirmée par MET, PCR ou ELISA de capture (5).

c) Isolement du virus sur membrane chorio-allantoïdienne d'œuf de poule embryonné

Le virus de la variole des camélidés peut être isolé sur membrane chorio-allantoïdienne (MCA) d'œufs de poule embryonné de 11 à 13 jours. Les œufs doivent être incubés à 37 °C et après 5 jours ceux qui contiennent des embryons vivants sont ouverts et la MCA est examinée pour rechercher la présence caractéristique des lésions varioliques : pustules épaisses et gris blanchâtres. Le virus ne tue pas les embryons. La température maxima qui permette la formation de ces lésions est de 38,5 °C. Lorsque les œufs sont incubés à 34,5 °C, elles sont plus plates et peuvent présenter un centre hémorragique (15).

d) Immunohistochimie

La détection de l'agent de la variole des camélidés par immunohistochimie est relativement rapide et peut remplacer la microscopie électronique pour établir un premier diagnostic (11). Presque tous les anticorps polyclonaux dirigés contre le virus de la variole des camélidés devraient donner des résultats acceptables dans cette épreuve, du fait de l'étroite homologie existante entre le virus de la vaccine et celui de la variole des camélidés (11).

- **Protocole**

La procédure d'épreuve immunochimique suivante est celle décrite par Kinne *et al.* (6) et Pfeffer *et al.* (14). La pustule cutanée doit être entièrement prélevée en vue de cette épreuve. Fixer le tissu dans du formol à 10 %, déshydrater par passage en gradients d'alcool et inclure en blocs de paraffine selon les procédures histopathologiques normalisées. Réaliser des coupes de 3 µm et les déposer sur une lame porte-objets. Traiter 5 min les coupes déparaffinées et déshydratées avec H₂O₂ à 3 % en eau distillée, puis laver au PBS. Incuber les lames 60 min à 37 °C avec l'anticorps monoclonal 5B4 dirigé contre le virus de la vaccine, dilué à 1/500. Laver deux fois au PBS pour éliminer cet anticorps. Incuber les lames 30 min avec des anticorps anti-souris marqués à la biotine (ABC-kit, Dako, Glostrup, Danemark). Laver 5 min en PBS et incuber 30 min avec de la streptavidine-peroxydase. Laver à nouveau 5 min en PBS et ajouter de la diaminobenzidine (chromogène) pendant 10 min.

e) Amplification en chaîne par polymérase

La PCR est une méthode rapide et sensible de détection de l'ADN des virus orthopox. Un test PCR générique, décrit par Meyer *et al.* (10), permet de reconnaître et de distinguer les espèces du genre *Orthopoxvirus* en se fondant sur la différence de taille de leurs amplicons. En utilisant la paire d'amorces 5'-AAT-ACA-AGG-AGG-ATC-T-3' et 5'-CTT-AAC-TTT-TTC-TTT-CTC-3', la séquence de gènes codant la protéine d'inclusion de type A (ATIP) sera amplifiée. La taille du produit obtenu, spécifique du virus de la variole des camélidés, est de 881 pb.

- **Protocole**

Suspendre une petite aliquote de croûtes broyées dans 90 µl d'une solution de lyse (50 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM Na₂ EDTA, 100 mM NaCl, 1 % de dodécyl sulfate de sodium) et ajouter 10 µl de protéinase K (20 mg/ml, Invitrogen). Digérer l'échantillon 10 min à 37 °C avant de dilacérer la croûte ou le tissu avec un pilon dans un tube à centrifugation. Rajouter 350 µl de la solution de lyse et 50 µl de protéinase K, mélanger doucement et incuber 3 h à 37 °C. Extraire la suspension lysée avec un égal volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) et centrifuger à 8 000 *g* à 4 °C pendant 1 min. Récolter la phase aqueuse surnageante et la mélanger de nouveau avec un égal volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). Centrifuger à 8 000 *g* à 4 °C pendant 1 min et transférer la phase aqueuse supérieure dans un tube neuf. Précipiter l'ADN en ajoutant 1/10 en volume d'acétate de sodium 3 M et deux volumes d'éthanol absolu glacé. Placer le mélange 30 min à -70 °C ou toute une nuit à -20 °C. Centrifuger 5 min à 15 000 *g* à 4 °C. Écarter le surnageant et laver le culot avec 0,5 ml d'éthanol à 70 %. Centrifuger 5 min à 15 000 *g*. Écarter le surnageant et sécher les culots à l'air. Remettre ces derniers en suspension dans 10 µl d'eau exempte de nucléase.

L'amplification de l'ADN est réalisée dans un volume final de 50 µl contenant 2 µl de chaque dNTP (10 mM), 5 µl de 10 × tampon PCR, 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de chaque amorce, 2,5 U de *Taq* ADN polymérase, 1 µl de matrice ADN et une quantité suffisante d'eau exempte de nucléase.

Incuber les échantillons dans un cycleur thermique : 5 min à 94 °C (première étape de dénaturation), second cycle : 1 min à 94 °C, 1 min à 45 °C, 2,5 min à 72 °C. Répéter 29 fois le second cycle. Dernier cycle : 10 min à 72 °C (étape d'élongation finale) et garder à 4 °C jusqu'à l'analyse.

Mélanger 10 µl d'un échantillon avec la solution de charge de teinture et charger dans un gel d'agarose à 1 % en tampon TBE (Tris/Borate/EDTA) contenant du bromure d'éthidium. Charger une ligne parallèle avec une échelle marqueur d'ADN de 100 pb. Séparer les produits 30-40 min à 100 V et observer en lumière ultra-violette. Confirmer les réactions positives en fonction de la taille des bandes.

Il existe dans le commerce un kit PCR qui permet de détecter l'ADN des virus orthopox et contient un second système d'amplification « conventionnel » composé d'amorces du gène de l'hémagglutinine (HA) des virus orthopox. L'amplicon peut être séquencé et identifié en le comparant avec des séquences de virus orthopox déjà connues.

2. Épreuves sérologiques

Tous les virus du genre *Orthopoxvirus* présentent des réactions sérologiques croisées. Toutefois, le virus de la variole des camélidés est le seul de son genre qui puisse provoquer des lésions varioliformes chez les camélidés. Il n'y a pas de réaction croisée entre les virus parapox et celui de la variole des camélidés, ce qui permet de distinguer sérologiquement les infections causées par ces deux virus. La plupart des épreuves sérologiques habituelles demandent beaucoup de temps et de travail, ce qui n'en fait pas de bonnes méthodes pour un premier diagnostic. Ces épreuves constituent quand même un outil précieux pour confirmer un diagnostic et pour des études épidémiologiques rétrospectives dans les régions où les camélidés ne sont pas vaccinés.

a) Épreuve de séroneutralisation virale

Dans cette méthode, les sérums à tester sont titrés contre un virus de la variole des camélidés de titre constant (100 DICT₅₀ [Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire]).

- **Protocole**

- i) Etiqueter les plaques de microtitrage ;
- ii) Diluer au 1/5 les sérums à tester, ainsi que les sérums témoins négatif et positif, dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) ;
- iii) Inactiver les sérums 30 min à 56 °C ;
- iv) Ajouter le milieu de croissance (DMEM additionné de 5 à 10 % de sérum de veau fœtal et d'antibiotiques) dans les puits :
 - 100 µl dans les rangées A à H, colonnes 2 à 6 (sérums à tester, sérums témoins négatif et positif) et dans les rangées A à D colonnes 7 à 12 (rangées témoin virus),
 - 200 µl dans les rangées G à H, colonnes 7 à 12 (rangées témoin cellules) ;
- v) Ajouter les sérums à tester, ainsi que les sérums témoins négatif et positif dilués et inactivés : 200 µl/puits dans les rangées A à H, colonne 1 (rangée double pour chaque échantillon) ;
- vi) Prélever 100 µl dans les puits des sérums à tester (dilution au 1/5) et préparer des dilutions de deux en deux (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160) des échantillons de sérums dans la plaque de microtitrage avec une multi-pipette. Rejeter 100 µl des derniers puits ;
- vii) Préparer une dilution à 100 DICT₅₀/100 µl de la suspension virale, comme semence de travail, avec un titre connu supérieur à log₁₀ 6 DICT₅₀ ;
- viii) Préparer une série de dilutions de 10 en 10 de la semence de travail (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) ;
- ix) Ajouter 100 µl de chaque dilution du virus dans les rangées témoin virus :
 - Semence de travail dans les rangées A à D, colonnes 7 et 8,
 - Dilution à 10⁻¹ de la semence de travail dans les rangées A à D, colonne 9,
 - Dilution à 10⁻² de la semence de travail dans les rangées A à D, colonne 10,
 - Dilution à 10⁻³ de la semence de travail dans les rangées A à D, colonne 11,
 - Dilution à 10⁻⁴ de la semence de travail dans les rangées A à D, colonne 12 ;
- x) Ajouter 100 µl de la semence de travail dans chaque puits des rangées de sérums à tester, ainsi que des sérums témoins négatif et positif ;
- xi) Incuber la plaque de microtitrage 1 h à 37 °C avec 5 % de CO₂ ;
- xii) Ajouter 80 µl d'une suspension de cellules sensibles, telles que des cellules de testicules d'agneau, à la concentration de 480 000 cellules/ml dans chaque puits ;
- xiii) Incuber à 37 °C avec 5 % de CO₂ ;
- xiv) Les résultats sont lus au microscope inversé. Observer quotidiennement les plaques de microtitrage. Les titres des sérums sont calculés et notés dès que l'effet cytopathogène est visible dans les puits témoin virus. Le test est valide si le virus titre environ 100 DICT₅₀. Le titre en anticorps est déterminé par la méthode de Spearman-Kärber.

b) Détection des anticorps du virus de la variole des camélidés par la méthode immuno-enzymatique ELISA

La procédure de détection des anticorps dirigés contre *Orthopoxvirus cameli* par ELISA a été décrite par Azwai *et al.* (2) et par Pfeffer *et al.* (14). La description suivante donne les indications générales sur la marche à suivre :

• Préparation de l'antigène

- i) Récolter la culture cellulaire quand 100 % des cellules sont infectées par le virus. Congeler et décongeler deux ou trois fois. Soumettre 30 s aux ultra-sons à 80 Hz, sous glace, pour faire sortir le virus des cellules ;
- ii) Centrifuger 10 min à 1 000 *g* et récolter le surnageant ;
- iii) Centrifuger le surnageant 1 h à 45 000 *g* à 4 °C. Remettre le culot en suspension dans du PBS ;
- iv) Ajouter du NaCl à une concentration finale de 330 mM et du polyéthylène glycol (PEG 6000) à une concentration finale de 7 % ;
- v) Agiter toute une nuit à 4 °C, centrifuger à 4 °C pendant 10 min à 3 000 *g* et laver deux fois le culot avec du NaCl 15 mM ;
- vi) Congeler et décongeler et traiter 3 h avec un détergent non ionique à 1 % (Nonidet P40, Sigma) à 37 °C ;
- vii) Congeler et décongeler et centrifuger 10 min à 3 000 *g* à 4 °C ;
- viii) Récolter le surnageant et le dialyser au moins trois fois contre du PBS ;
- ix) Mesurer la concentration en protéines selon la méthode décrite par Lowry (8) ;
- x) Conserver les aliquotes à –20 °C.

• Préparation du conjugué d'IgG de lapin anti-camélidé à la peroxydase de raifort

Le conjugué d'IgG de lapin anti-camélidé à la peroxydase de raifort n'est malheureusement pas commercialisé. La méthode de production d'anticorps monoclonaux d'IgM et d'IgG de camélidés a été décrite par Azwai *et al.* (1). On peut tout de même remplacer le conjugué d'IgG de lapin anti-camélidé à la peroxydase de raifort par un réactif commercialisé contenant des anticorps dirigés contre les IgG des camélidés du Nouveau-Monde et conjugués à la fluorescéine (Fluorescein Conjugated Camelid IgG, Kent Laboratories, Triple J Farms, USA).

- i) Précipiter deux fois les sérums de camélidés en ajoutant du sulfate d'ammonium à saturation jusqu'à une concentration finale de 40 % (v/v) (29,6 % de sulfate d'ammonium [p/v]) à température ambiante. Centrifuger 15 min à 12 000 *g* et dissoudre dans du PBS, pH 7,2. Dialyser toute une nuit contre du PBS en changeant plusieurs fois la solution.
- ii) Séparer les immunoglobulines par filtration en chromatographie sur gel : une colonne ACA-34 (LBK) (2,6 × 100 cm) peut être utilisée pour séparer selon leurs tailles les immunoglobulines (IgM et IgG) précipitées par le sel. L'élution peut se faire à 20 ml/h avec du PBS, permettant de récolter des fractions de 6 ml. Déterminer les concentrations de protéines par absorption à 280 nm.

• Production d'antisérum

Immuniser des lapins par injection sous-cutanée d'IgG de camélidés en émulsion dans un adjuvant approprié. Les animaux doivent être immunisés trois fois pour une meilleure production d'anticorps. Récolter les sérums et les conserver à –20 °C jusqu'à leur emploi.

• Protocole

On peut utiliser des plaques de microtitrage ELISA à 96 trous, non tapissées, telles que les plaques Immulon 2 de Dynatech.

- i) Tapisser les plaques de microtitrage avec un antigène préparé à 1 µg/ml dans du tampon carbonate/bicarbonate, 0,05 M, pH 9,6 (100 µl par puits).
- ii) Incuber les plaques ELISA en chambre humide (100 % d'humidité) 1 h à 37 °C puis toute une nuit à 4 °C.
- iii) Éliminer l'excédent d'antigène non fixé par un triple lavage avec du PBS additionné de 0,05 % de Tween 20 (PBS/Tween).

- iv) Ajouter, dans deux puits, 100 µl de sérum à tester et de sérum témoin à une dilution optimale prédéterminée, en tampon bloquant (PBS à 0,05 % de Tween 20, et 1 % de poudre de lait dégraissée).
- v) Incuber les plaques 30 min à 37 °C.
- vi) Laver les plaques trois fois en PBS/Tween.
- vii) Diluer le conjugué d'IgG de lapin anti-camélidé à la peroxydase de raifort, ou les IgG de camélidés conjuguées à la fluorescéine, à une dilution de travail prédéterminée en tampon bloquant et en mettre 100 µl par puits.
- viii) Incuber les plaques 30 min à 37 °C.
- ix) Laver les plaques trois fois en PBS/Tween.
- x) Visualiser la réaction en ajoutant 100 µl de chromogène 3,3' 5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) par puits et incuber 15 min à 37 °C sur agitateur.
- xi) Arrêter la réaction 10 min plus tard en ajoutant 50 µl de H₂SO₄ 2 M dans chaque puits.
- xii) Mesurer les valeurs au photomètre à 450 nm de longueur d'onde. Toute valeur supérieure à la moyenne + 2 écarts-types du sérum témoin négatif peut être considérée comme une réaction positive

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il existe un vaccin à virus atténué, le Ducapox, fabriqué par Highveld Biologicals, à Onderstepoort, en Afrique du Sud et un vaccin à virus inactivé fabriqué par Biopharma à Rabat au Maroc. Les vaccins à virus atténué offrent une protection de longue durée contre la variole des camélidés (19). Il est toutefois recommandé d'administrer une injection de rappel aux jeunes sujets vaccinés pour la première fois avant 6 à 9 mois. L'injection du vaccin à virus inactivé doit être renouvelée chaque année. Les instructions pour la production des vaccins à usage vétérinaire figurent au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ».

REMERCIEMENTS

Les auteurs souhaitent remercier le Docteur U. Wernery, Directeur scientifique du Central Veterinary Research Laboratory, Dubaï, Émirats Arabes Unis (EAU) ainsi que Madame R. Zachariah, Central Veterinary Research Laboratory, Dubaï, EAU, pour leurs précieux conseils dans le choix des tests appropriés dans ce chapitre et pour la description du l'ELISA de détection des anticorps.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AZWAI S.M., CARTER S.D. & WOLDEHIWET Z. (1995). Monoclonal antibodies against camel (*Camelus dromedarius*) IgG, IgM and light chains. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **45**, 175–184.
2. AZWAI S.M., CARTER S.D., WOLDEHIWET Z. & WERNERY U. (1996). Serology of *Orthopoxvirus cameli* infection in dromedary camels: Analysis by ELISA and western blotting. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **19** (1), 65–78.
3. COETZER J.A.W. (2004). Poxviridae. *In*: Infectious Diseases of Livestock, Second Edition, Coetzer J.A.W. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press, Southern Africa, Vol. 2, 1265–1267.
4. DAVIES F.G., MUNGAI J.N. & SHAW T. (1975). Characteristics of Kenyan camelpox virus. *J. Hygiene*, **75**, 381–385.
5. JOHANN S. & CZERNY C.-P. (1993). A rapid antigen capture ELISA for the detection of Orthopox viruses. *J. Vet. Med. [B]*, **40**, 569–581.
6. KINNE J., COOPER J.E. & WERNERY U. (1998). Pathological studies on camelpox lesions of the respiratory system in the United Arab Emirates (UAE). *J. Comp. Pathol.*, **118**, 257–266.
7. KRITZ B. (1982). A study of camelpox in Somalia. *J. Comp. Pathol.*, **92**, 1–8.

8. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
9. MAYER A. & CZERNY C.-P. (1990). Camelpox Virus. *In: Virus Infections of Vertebrates*, Vol. 3, Virus Infections of Ruminants, Dinter Z. & Morein B., eds. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, Chapter 4, 19–22.
10. MEYER H., PFEFFER M. & RZIHA H.-J. (1994). Sequence alterations within and downstream of the A-type inclusion protein genes allow differentiation of *Orthopoxvirus* species by polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.*, **75**, 1975–1981.
11. NOTHELFER H.B., WERNERY U. & CZERNY C.P. (1995). Camel pox: antigen detection within skin lesions – Immunohistochemistry as a simple method of etiological diagnosis. *J. Camel Pract. Res.*, **2** (2), 119–121.
12. PFEFFER M., MEYER H., WERNERY U. & KAADEN O.-R. (1996). Comparison of camelpox viruses isolated in Dubai. *Vet. Microbiol.*, **49**, 135–146.
13. PFEFFER M., NEUBAUER H., WERNERY U., KAADEN O.-R. & MEYER H. (1998). Fatal form of camelpox virus infection. *Vet. J.*, **155**, 107–109.
14. PFEFFER M., WERNERY U., KAADEN O.-R. & MEYER H. (1998). Diagnostic procedures for poxvirus infections in camelids. *J. Camel Pract. Res.*, **5** (2), 189–195.
15. TANTAWI H.H., SABAN M.S., REDA I.M. & EL-DAHABY H (1974). Camelpox virus in Egypt I – Isolation and Characterization. *Bull. Epizoot. Dis. Africa*, **22** (4), 315–319.
16. WERNERY U. & KAADEN O.-R. (2002). Camel pox. *In: Infectious Diseases in Camelids*, Second Edition, Wernery U. & Kaaden O.-R., eds. Blackwell Science Berlin, Vienna, 176–185.
17. WERNERY U., KAADEN O.-R. & ALI M. (1997). Orthopox virus infections in dromedary camels in United Arab Emirates (U.A.E.) during winter season. *J. Camel Pract. Res.*, **4** (1), 51–55.
18. WERNERY U., MEYER H. & PFEFFER M. (1997). Camel pox in the United Arab Emirates and its prevention. *J. Camel Pract. Res.*, **4** (2), 135–139.
19. WERNERY U. & ZACHARIAH R. (1999). Experimental camel pox infection in vaccinated and unvaccinated dromedaries. *J. Vet. Med. [B] Infect. Dis.*, **46** (2), 131–136.
20. YAGER J.A., SCOTT D.W. & WILCOCK B.P. (1991). Viral diseases of the skin. *In: Pathology of Domestic Animals*, Fourth Edition, Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N., eds. Academic Press, San Diego, USA, 629–644.

*
* *

CAMPYLOBACTER JEJUNI ET CAMPYLOBACTER COLI

RÉSUMÉ

Définition de la maladie : *Campylobacter jejuni* et *C. coli* peuvent coloniser le tractus digestif de la plupart des mammifères et des oiseaux et sont les espèces de *Campylobacter* les plus fréquemment isolées chez l'homme présentant une gastro-entérite. La transmission de l'animal à l'homme se fait principalement par le biais de consommation ou de manipulation de produits alimentaires d'origine animale, mais le contact direct avec des animaux infectés peut aussi contribuer à la transmission de la campylobactériose humaine. Ce chapitre met l'accent sur *C. jejuni* et *C. coli* dans les productions primaires d'origine animale en relation avec la sécurité sanitaire des aliments.

Description de la maladie : *Campylobacter jejuni* et *C. coli* n'entraînent pas de maladie chez les animaux adultes à l'exception de quelques cas sporadiques d'avortement chez les ruminants et de très rares cas d'hépatites chez les autruches. La contamination fécale de la viande (particulièrement la viande de volaille) pendant les opérations d'abattage est considérée comme une source majeure d'intoxications alimentaires humaines. Chez l'homme, des infections extra-intestinales incluant la bactériémie, sont observées et certaines séquelles de l'infection comme les polyneuropathies bien que rares peuvent être graves.

Identification de l'agent pathogène : chez les mammifères et chez les oiseaux, le dépistage de la colonisation intestinale repose sur l'isolement du micro-organisme à partir des fèces, d'écouvillons rectaux et/ou des contenus caecaux. *Campylobacter jejuni* et *C. coli* sont des bactéries thermotolérantes, à coloration de Gram négative, très mobiles, qui nécessitent pour une croissance optimale des conditions micro-aérophiles comprises entre 37 et 42 °C. Des milieux gélosés contenant des antibiotiques sélectifs sont nécessaires pour isoler ces bactéries à partir d'échantillons fécaux ou intestinaux. Sinon leur grande mobilité peut être mise à profit pour l'isolement par des techniques de filtration. Des méthodes d'enrichissement pour détecter la colonisation intestinale ne sont pas utilisées en routine. Une confirmation préliminaire des isolats peut être faite par microscopie optique. Les micro-organismes en phase exponentielle de croissance sont de courts bacilles en forme de S tandis que les formes coccoïdes prédominent dans les cultures plus vieilles. En microscopie à contraste de phase, les micro-organismes ont une mobilité rapide caractéristique en vrille. L'identification phénotypique est basée sur des réactions sous différentes conditions de croissance. Des tests biochimiques et moléculaires peuvent être utilisés pour identifier différentes espèces de *Campylobacter*. Les épreuves d'amplification en chaîne par polymérase peuvent aussi être utiles pour la détection directe de *C. jejuni* et *C. coli*.

Épreuves sérologiques : aucun test sérologique n'est utilisé en routine pour le diagnostic de la colonisation par *C. jejuni* et *C. coli*.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : il n'existe pas de vaccin efficace disponible pour la prévention des infections entériques à *Campylobacter* des oiseaux ou des mammifères.

A. INTRODUCTION

1. La maladie

Campylobacter jejuni et *C. coli* sont considérés généralement comme des micro-organismes commensaux du bétail, des animaux de compagnie et des oiseaux. Un grand nombre de *Campylobacter* ont été isolés de jeunes animaux, notamment des porcelets, des agneaux et des veaux, présentant une entérite, mais ces micro-organismes sont aussi retrouvés chez des animaux sains. Des foyers d'hépatite aviaire ont été signalés mais le rôle pathogène de *Campylobacter* spp. n'est pas certain. Une exception concerne les autruches chez lesquelles *Campylobacter* est associée à une mortalité et chez qui une entérite est observée chez les jeunes. Les *Campylobacter* sont la principale cause de maladie intestinale d'origine bactérienne chez l'homme et elle a été identifiée dans de nombreux pays industrialisés (24). Plus de 80 % des cas sont dus à *C. jejuni* et près de 10 % sont dus à *C. coli*. Chez l'homme les infections à *C. jejuni/C. coli* sont associées avec une entérite aiguë et des douleurs abdominales qui durent au moins 7 jours. Bien que ce type d'infection s'arrête de lui-même, des complications peuvent survenir telles qu'une bactériémie, un syndrome de Guillain-Barré, une arthrite réactionnelle et un avortement (21). On considère que la principale source des infections à *C. jejuni/C. coli* chez l'homme est la manipulation ou la consommation de viande contaminée en particulier la viande de volaille. Cependant, les contacts avec des animaux de compagnie ou du bétail, la consommation d'eau contaminée ou de lait cru, les voyages dans des régions à prévalence élevée sont autant de facteurs de risque pour l'apparition de la maladie chez l'homme (8). De nos jours, le contrôle des *Campylobacter* dans la chaîne alimentaire est devenu un des principaux objectifs des responsables de la sécurité sanitaire des aliments dans le monde entier.

2. Taxonomie

En 1991, la taxonomie a été revue et une nouvelle nomenclature du genre *Campylobacter* a été proposée. Selon le Manuel de Bergey, le genre *Campylobacter* comprend 16 espèces et 6 sous-espèces. Récemment, deux espèces supplémentaires ont été proposées (25). Les micro-organismes de ce genre sont typiquement des bactéries à coloration de Gram négative, asporulées, en forme de S ou de spirale (0,2 à 0,8 µm de large et 0,5 à 5 µm de long) avec un seul flagelle polaire à l'une ou aux deux extrémités, leur conférant une mobilité caractéristique en virile. Ces bactéries sont micro-aérophiles, mais certaines souches peuvent également pousser en aérobiose ou en anaérobiose. Elles ne fermentent ni n'oxydent les hydrates de carbone. Quelques espèces, en particulier *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*, sont thermotolérantes avec un optimum de croissance à 42 °C. Elles peuvent coloniser les muqueuses, d'ordinaire le tractus intestinal de la plupart des espèces testées de mammifères et d'oiseaux. L'espèce *C. jejuni* comprend deux sous-espèces (*C. jejuni* subsp. *jejuni* et *C. jejuni* subsp. *doylei*) qui peuvent être différenciées sur la base de plusieurs tests phénotypiques (réduction du nitrate, réduction du sélénite, fluorure de sodium et safranine) et croissance à 42 °C (la sous-espèce *doylei* ne cultive pas à 42 °C) (9). La sous-espèce *jejuni* est bien plus fréquemment isolée que la sous-espèce *doylei*.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Isolement et identification de l'agent

Il existe deux procédures ISO (Organisation internationale de normalisation) pour la détection de *Campylobacter*, une méthode horizontale pour la recherche de *Campylobacter* thermotolérants dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale (10) et une procédure ISO pour la recherche de *Campylobacter* à partir de l'eau (11). Cependant aucune de ces méthodes classiques n'est optimale pour l'isolement de *Campylobacter* à partir d'animaux vivants. Une annexe à l'ISO 10272 (méthode horizontale) concernant ce sujet est actuellement en cours de rédaction.

a) Prélèvement des échantillons

i) Volailles dans les élevages

Les volailles sont fréquemment trouvées porteuses de *C. jejuni* (65 à 95 %), moins souvent de *C. coli* et rarement d'autres espèces (16). Les niveaux de colonisation des poulets de chair sont liés à leur âge. La plupart des lots sont négatifs jusqu'à l'âge de 2 semaines. Dès que la colonisation par *Campylobacter* a eu lieu dans un lot de poulets, la transmission est extrêmement rapide du fait de la coprophagie et jusqu'à 100 % des oiseaux d'un lot deviennent infectés en 72 h. Les échantillons provenant d'oiseaux vivants destinés à la chaîne alimentaire, doivent donc être récoltés aussi près que possible de l'abattage (16). La plupart des oiseaux excrètent un grand nombre de micro-organismes (> 10⁶ unités formant colonie par g de fèces). Les campylobacters peuvent être isolés de fientes caecales ou intestinales fraîches ou d'écouvillons cloacaux. Pour une détection fiable de *Campylobacter* par culture, des fientes fraîches (sans trace d'urine de préférence) doivent être

récoltées. Ces échantillons doivent être protégés de la dessiccation. Quand des écouvillons sont utilisés, un milieu de transport (tel que Amies, Cary Blair ou Stuart) doit être utilisé.

ii) *Bovins, moutons et porcs à la ferme*

Les campylobacters colonisent fréquemment l'intestin du bétail, tels que bovins, moutons et porcs (2, 26, 27). Les bovins et les moutons sont colonisés principalement par *C. jejuni*, *C. coli*, *C. hyointestinalis*, et *C. fetus*, alors que les porcs sont contaminés de façon prédominante par *C. coli*. Chez les jeunes animaux, les nombres sont plus grands que chez les animaux plus âgés. Chez les animaux plus âgés, les micro-organismes peuvent être détectés de manière intermittente dans les fèces, probablement en raison de faibles nombres ou du fait d'une excrétion intermittente. Des échantillons frais doivent être récoltés (échantillons rectaux si possible) et doivent être protégés du dessèchement. Quand des écouvillons sont utilisés, un milieu de transport (tel que Amies, Cary Blair ou Stuart) doit être utilisé.

iii) *À l'abattoir*

Chez les volailles, les caecums sont généralement utilisés pour la détection de *Campylobacter*. Ils peuvent être séparés du reste de l'intestin avec des ciseaux stériles, et adressés intacts au laboratoire dans un sac plastic ou une boîte de Petri.

Pour les bovins, moutons ou porcs, les échantillons sont récoltés à partir des intestins en ouvrant aseptiquement la paroi intestinale ou en réalisant des écouvillonnages rectaux.

b) Transport et traitement des échantillons

i) *Transport*

Les campylobacters sont particulièrement sensibles aux conditions environnementales, en particulier la déshydratation, l'oxygène atmosphérique, la lumière du soleil et les températures élevées. Le transport au laboratoire et les étapes suivantes doivent donc être aussi rapides que possible, de préférence le jour même et au moins dans les 2 jours. Les échantillons doivent être protégés de la lumière.

Il n'est pas possible de recommander une température idéale de transport, mais il est clair que la congélation ou les fortes températures peuvent réduire la viabilité. Les fortes températures ($> 20^{\circ}\text{C}$), les faibles températures ($< 0^{\circ}\text{C}$) et les fluctuations de température doivent être évitées. Quand le délai entre l'échantillon et son traitement est plus long, un stockage à 4°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) est conseillé.

ii) *Milieus de transport*

Ecouvillons : pour les échantillons sous forme d'écouvillons, l'utilisation de tubes de transport contenant un milieu tel que Amies est recommandée. Ce milieu peut être une gélose brute ou un milieu au charbon. Le rôle du milieu n'est pas de permettre la croissance de *Campylobacter* spp., mais sa protection contre le dessèchement et les effets toxiques de l'oxygène.

Quand seulement de petites quantités de matières fécales ou cæcales peuvent être prélevées et que les tubes de transport ne sont pas disponibles, l'envoi des échantillons en milieu de transport est recommandé. Plusieurs milieux de transport ont été décrits : milieux de Cary-Blair, milieu de Stuart modifié, milieu Campy-thioglycolate, eau peptonée alcaline et milieu semi-solide pour test de la mobilité. De bons résultats de ré-isollement ont été obtenus en utilisant le milieu de Cary-Blair (13, 20).

iii) *Conservation des échantillons*

À l'arrivée au laboratoire, les échantillons doivent être traités le plus rapidement possible, de préférence le jour d'arrivée, sinon au moins dans les 3 jours qui suivent la collecte. Pour éviter les variations de température, les échantillons ne doivent être réfrigérés que s'ils ne peuvent être traités le jour même, sinon ils doivent être conservés à température ambiante. Quand les échantillons soumis ou conservés au laboratoire sont à 4°C , ils doivent être amenés à température ambiante avant traitement pour éviter les chocs thermiques.

c) Isolement de *Campylobacter*

Pour l'isolement de *Campylobacter* à partir d'échantillons fécaux/caecaux ou intestinaux un pré-traitement n'est pas nécessaire, et les échantillons peuvent être ensemencés sur milieux sélectifs ou traités par la méthode de filtration sur milieux gélosés non sélectifs. Pour les échantillons caecaux, les caecums sont ouverts de manière aseptique en coupant le bout avec des ciseaux stériles et le contenu est extrait pour être traité. L'enrichissement est recommandé pour améliorer la sensibilité de culture de micro-organismes potentiellement stressés par l'environnement ou dans le cas de faibles nombres de micro-organismes dans

les fèces, par exemple de bovins, moutons ou porcs. Cependant l'enrichissement à partir de ces derniers n'est pas réalisé en routine et est seulement réservé aux travaux de recherche.

i) *Milieux sélectifs pour isolement*

De nombreux milieux sont d'usage courant pour la culture de *Campylobacter* spp. La gélose modifiée au charbon, à la céfoperazone et au désoxycholate (mCCDA) est recommandée bien que d'autres milieux puissent être utilisés. Une description détaillée des procédures pour la détection de *Campylobacter* et de la variété des milieux existants est donnée par Corry *et al.* (6, 7). Les milieux sélectifs peuvent être divisés en deux grandes catégories : les milieux contenant du sang et les milieux contenant du charbon. Les composants du sang et le charbon permettent d'éliminer les dérivés oxygénés. La plupart des milieux sont disponibles dans le commerce. La sélectivité des milieux dépend des antibiotiques utilisés. Les céphalosporines (en règle générale la céfoperazone) sont utilisées parfois en combinaison avec d'autres antibiotiques (par exemple vancomycine, triméthoprim). La cycloheximide (actidione) et plus récemment, l'amphotéricine B, sont utilisées pour inhiber les levures et les moisissures (15). La principale différence entre les milieux est leur capacité à inhiber la flore contaminante. Tous les agents sélectifs permettent la croissance de *C. jejuni* et *C. coli*. Il n'existe pas de milieu disponible qui permette de cultiver *C. jejuni* et inhibe *C. coli* ou inversement. En règle générale, les autres espèces de *Campylobacter* (par exemple *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. fetus* et *C. hyointestinalis*) cultivent sur la plupart des milieux, en particulier à la température moins sélective de 37 °C.

Exemples de milieux solides sélectifs contenant du sang :

- Gélose de Preston
- Gélose de Skirrow
- Gélose de Butzler
- Campy-cefex

Exemples de milieux solides contenant du charbon :

- mCCDA (milieu gélosé modifié au charbon, à la céfoperazone et au désoxycholate), version légèrement modifiée du milieu initialement décrit CCDA (milieu gélosé au charbon, à la céfoperazone et au désoxycholate) (4, 5)
- Gélose Karmali ou CSM (milieu sélectif au charbon) (12)
- Gélose CAT agar (céfoperazone, amphotéricine et teicoplanine), favorisant la croissance de *C. upsaliensis* (1).

ii) *Filtration passive*

La filtration passive évite l'utilisation de milieux sélectifs et est, de ce fait, très utile pour l'isolement des espèces de *Campylobacter* plus sensibles aux antibiotiques. Cette méthode a été développée par Steele & McDermott (22). Comme cette méthode ne nécessite pas de milieux sélectifs coûteux, elle peut être utilisée dans les laboratoires ayant des ressources limitées. Pour la filtration passive, les fèces sont mélangées avec le PBS (dilution au 1/10^e environ) pour préparer une suspension. Environ 100 µl de cette suspension sont ensuite déposés délicatement sur une membrane avec des pores de 0,45 ou 0,65 µm, qui a été au préalable placée à la surface d'une gélose au sang non sélective. Il faut prendre soin de ne pas laisser l'inoculum déborder des bords du filtre. Une incubation de 30 à 45 min à 37 °C ou à température ambiante permet de laisser les bactéries migrer à travers les pores du filtre. Le filtre est ensuite retiré, le fluide qui a traversé le filtre est étalé à l'aide d'un étaleur stérile en verre ou en plastique et la boîte est incubée en atmosphère micro-aérophile à 42 °C.

iii) *Incubation*

• *Atmosphère*

Des atmosphères micro-aérophiles avec 5 à 10 % d'oxygène et 5 à 10 % de dioxyde de carbone sont nécessaires pour une croissance optimale (7, 25). Des conditions adéquates d'atmosphère peuvent être produites par diverses méthodes. Dans certains laboratoires, des évacuations (répétées) du gaz présent dans la jarre suivies d'un remplacement de l'atmosphère par des gaz en bouteille sont utilisées. Des kits de production de gaz sont disponibles dans le commerce. Des incubateurs à atmosphère variable sont plus adaptés si de grands nombres de cultures doivent être réalisés.

• *Température*

Les milieux peuvent être incubés à 37 °C ou à 42 °C, mais il est courant d'incuber à 42 °C pour minimiser la croissance des contaminants et favoriser sélectivement la croissance de *C. jejuni*/*C. coli*. Les agents antifongiques cycloheximide ou amphotéricine sont ajoutés pour empêcher la croissance des levures et moisissures à 37 °C (5). Dans certains laboratoires, l'incubation est réalisée à 41,5 °C en vue d'harmoniser avec les protocoles d'isolement de *Salmonella* et d'*E. coli* O157 (10).

- **Durée**

La croissance de *Campylobacter jejuni* et *C. coli* est d'ordinaire visible sur milieu solide en 24 à 48 h à 42 °C. Le nombre d'échantillons supplémentaires positifs après incubation prolongée étant très bas, une durée d'incubation de 48 h est recommandée pour le diagnostic de routine (5).

d) Confirmation

Une culture pure est nécessaire pour les tests de confirmation, mais une confirmation préliminaire peut être obtenue par examen direct au microscope de colonies suspectes.

- Identification sur milieu solide** : sur le milieu de Skirrow ou d'autres géloses contenant du sang, les colonies caractéristiques de *Campylobacter* sont légèrement roses, rondes, convexes, lisses et brillantes, avec un bord régulier. Sur les milieux contenant du charbon comme le mCCDA, les colonies caractéristiques sont grisâtres, plates et humides avec une tendance à l'étalement, elles peuvent avoir un reflet métallique.
- Examen microscopique de la morphologie et de la mobilité** : une colonie suspecte est mise en suspension en solution saline et examinée, de préférence à l'aide d'un microscope à contraste de phase, pour rechercher des petits bacilles minces, spiralés ou incurvés, avec une mobilité en vrille qui sont caractéristiques. Des cultures plus âgées montrent des formes *coccoïdes* moins mobiles.
- Détection de l'oxydase** : prendre une fraction de colonie suspecte et la déposer sur un papier filtre humecté de réactif pour la recherche de l'oxydase. L'apparition d'une couleur violette ou bleu intense dans les 10 s indique une réaction positive. Si un kit commercial pour la recherche de l'oxydase est utilisé, suivre les instructions du fabricant.
- Croissance à 25 °C en atmosphère micro-aérophile** : inoculer la culture pure sur un milieu non sélectif au sang et incubé à 25 °C en atmosphère micro-aérophile pendant 48 h.
- Croissance à 41,5 °C en aérobiose** : inoculer la culture pure sur un milieu non sélectif au sang et incubé à 41,5 °C en aérobiose pendant 48 h.
- Tests d'agglutination au latex** : des tests d'agglutination au latex pour la confirmation des cultures pures de *C. jejuni*/*C. coli* (et souvent également *C. lari*) sont disponibles dans le commerce.

e) Identification de *Campylobacter* au niveau de l'espèce

Parmi les *Campylobacter* spp. poussant à 42 °C, les espèces les plus fréquemment rencontrées à partir d'échantillons d'origine animale sont *C. jejuni* et *C. coli*. Cependant, d'autres espèces sont plus rarement signalées. D'ordinaire, *C. jejuni* peut être différencié des autres espèces de *Campylobacter* sur la base de l'hydrolyse de l'hippurate car c'est la seule espèce positive pour l'hippurate isolé d'échantillons provenant d'animaux ou d'aliments. L'existence de souches de *C. jejuni* négatives pour le test de l'hippurate a été décrite (23). Le tableau 2 indique quelques caractéristiques phénotypiques des espèces les plus importantes de campylobacters thermotolérants (10). La sensibilité à l'acide nalidixique était une des caractéristiques les plus utilisées, mais elle risque de poser des difficultés d'interprétation du fait de l'augmentation des souches de *C. jejuni* et *C. coli* résistantes à l'acide nalidixique et de l'isolement de génogroupes de *C. lari* sensibles à l'acide nalidixique. Des protocoles d'identification plus détaillés ont été décrits dans la littérature (18, 25). Les résultats du diagnostic d'espèce devraient être confirmés à l'aide de témoins positifs et négatifs définis.

Les tests de confirmation de la présence de campylobacters thermotolérants et leur interprétation (10) sont donnés dans le tableau 1. Des témoins positifs et négatifs doivent valider les résultats des tests de confirmation.

Tableau 1. Tests de confirmation pour les *Campylobacters* thermotolérants

Test de confirmation	Résultat pour les <i>Campylobacters</i> thermotolérants
Morphologie	Petits bacilles incurvés
Mobilité	Caractéristique (mobilité en vrille et élevée)
Oxydase	+
Croissance à 41,5 °C en aérobiose	–
Croissance à 25 °C en conditions micro-aérophiles	–

Tableau 2. Caractéristiques phénotypiques de base des principaux *Campylobacter thermotolérants*

Caractéristique	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
Hydrolyse de l'hippurate	+	–	–
Hydrolyse de l'acétate d'indoxyl	+	+	–

Légende commune aux deux tableaux : + = positif ; – = négatif

- i) **Détection de l'hydrolyse de l'hippurate** : suspendre le matériel prélevé à l'aide d'une anse à partir d'une colonie suspecte dans 400 µl d'une solution d'hippurate de sodium à 1 % (attention de ne pas incorporer d'agar). Incuber à 37 °C pendant 2 h, puis ajouter lentement 200 µl d'une solution à 3,5 % de ninhydrine sur le côté du tube de manière à former une couche supérieure. Incuber de nouveau à 37 °C pendant 10 min et lire la réaction. Réaction positive : violet sombre/bleu. Réaction négative : absence de changement de couleur ou gris. Si des disques commerciaux d'hydrolyse de l'hippurate sont utilisés, suivre les instructions du fabricant.
- ii) **Détection de l'hydrolyse de l'acétate d'indoxyl** : placer une colonie suspecte sur un disque d'acétate d'indoxyl et ajouter une goutte d'eau distillée stérile. Si l'acétate d'indoxyl est hydrolysé, la couleur vire au bleu sombre dans les 5 à 10 min. L'absence de changement de couleur indique l'absence d'hydrolyse. Si des disques commerciaux d'hydrolyse de l'acétate d'indoxyl sont utilisés, suivre les instructions du fabricant.

L'identification biochimique peut être complétée ou même remplacée par des méthodes moléculaires. Divers tests d'identification basés sur des sondes ADN ou sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été décrits pour les espèces de *Campylobacter* (17, 24). On *et al.* (18) ont évalué la spécificité de 11 tests basés sur la PCR pour l'identification de *C. Jejuni* et *C. coli*.

f) Détection moléculaire de *Campylobacter*

Les méthodes basées sur la PCR pour la détection de *Campylobacter* dans les échantillons de fèces d'animaux et de viande après enrichissement ont déjà été décrites dans la littérature (17). L'un de ces essais est utilisé en routine au Danemark pour le dépistage à partir d'écouvillons cloacaux de poulets de chair à l'abattoir (3, 14).

g) Épreuves basées sur une capture antigénique

Plusieurs épreuves immuno-enzymatiques sont disponibles uniquement pour la détection de *Campylobacter* dans les échantillons de selles humaines.

2. Épreuves sérologiques

Il n'existe pas d'épreuve sérologique validée développée pour le dépistage de la colonisation du bétail par *C. jejuni* / *C. coli*.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'existe pas de vaccin développé spécifiquement pour *C. jejuni* ou *C. coli* pour les animaux ou les oiseaux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ASPINALL S.T., WAREING D.R.A., HAYWARD P.G. & HUTCHINSON D.N. (1993). Selective medium for thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. *J. Clin. Pathol.*, **46**, 829–831.
2. ATABAY H.I. & CORRY J.E.L. (1998). The isolation and prevalence of campylobacters from dairy cattle using a variety of methods. *J. Appl. Microbiol.*, **84**, 733–740.
3. BANG D.D., PEDERSEN K. & MADSEN M. (2001). Development of a PCR assay suitable for *Campylobacter* spp. mass screening programs in broiler production. *J. Rapid Meth. Automat. Microbiol.*, **9**, 97–113.

4. BOLTON F.J., HUTCHINSON D.N. & COATES D. (1984). Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces. *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 169–171.
5. BOLTON F.J., HUTCHINSON D.N. & PARKER G. (1988). Reassessment of selective agars and filtration techniques for isolation of *Campylobacter* species from faeces. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **7**, 155–160.
6. CORRY J.E.L., ATABAY H.I., FORSYTHE S.J. & MANSFIELD L.P. (2003). Culture media for the isolation of campylobacters, helicobacter and arcobacters. *In: Handbook of Culture Media for Food Microbiology*, Second Edition, Corry J.E.L., Curtis G.D.W. & Baird R.M. eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 271–315.
7. CORRY J.E.L., POST D.E., COLIN P. & LAISNEY M.J. (1995). Culture media for the isolation of campylobacters. *Int. J. Food Microbiol.*, **26**, 43–76.
8. FRIEDMAN C.R., NEIMANN J., WEGENER H.C. & TAUXE R.V. (2000). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. *In: Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 121–138.
9. GARRITY G.M. (EDITOR-IN-CHIEF) (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition. Springer-Verlag, New York, USA.
10. ISO 10272-1:2006 AND ISO/TS 10272-2:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method; Part 2: Colony count technique. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.
11. ISO 17995:2005. Water quality – Detection and enumeration of thermophilic *Campylobacter species*. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.
12. KARMAI M.A., SIMOR A.E., ROSCOE M., FLEMING P.C., SMITH S.S. & LANE J. (1986). Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 456–459.
13. LUECHTEFELD N.W., WANG W.L., BLASER M.J. & RELLER L.B. (1981). Evaluation of transport and storage techniques for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from turkey cecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **13**, 438–443.
14. LUND M., WEDDERKOPP A., WAINO M., NORDENTOFT S., BANG D.D., PEDERSEN K., & MADSEN M. (2003). Evaluation of PCR for detection of *Campylobacter* in a national broiler surveillance programme in Denmark. *J. Appl. Microbiol.*, **94**, 929–935.
15. MARTIN K.W., MATTICK K.L., HARRISON M. & HUMPHREY T.J. (2002). Evaluation of selective media for *Campylobacter* isolation when cycloheximide is replaced with amphotericin B. *Lett. Appl. Microbiol.*, **34**, 124–129.
16. NEWELL D.G. & WAGENAAR J.A. (2000). Poultry infections and their control at the farm level. *In: Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 497–509.
17. OLSEN J.E., ABO S., HILL W., NOTERMANS S., WERNARS K., GRANUM P.E., POPVIC T., RASMUSSEN H.N. & OLSVIK O. (1995). Probes and polymerase chain reaction for the detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, **28**, 1–78.
18. ON S.L.W. (1996). Identification methods for Campylobacters, Helicobacters, and Related organisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, **9**, 405–422.
19. ON S.L.W. & JORDAN P.J. (2003). Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 330–336.
20. SJOGREN E., LINDBLOM G.B. & KAIJSER B. (1987). Comparison of different procedures, transport media, and enrichment media for isolation of *Campylobacter* species from healthy laying hens and humans with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 1966–1968.

21. SKIRROW M.B. & BLASER M.J. (2000). Clinical aspects of *Campylobacter* infection. *In: Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 69–88.
22. STEELE T.W. & McDERMOTT S.N. (1984). The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology*, **16**, 263–265.
23. STEINHAUSEROVA I., CESKOVA J., FOJTIKOVA K. & OBROVSKA I. (2001). Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 470–475.
24. TAUXE R.V. (1992). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. *In: Campylobacter jejuni: current state and future trends*, Nachamkin I., Blaser M.J. & Tompkins L.S., eds. ASM Press, Washington DC, USA, 9–19.
25. VANDAMME P. (2000). Taxonomy of the family Campylobacteraceae. *In: Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 3–26.
26. WEIJTENS M. (1996). *Campylobacter* in pigs (dissertation). Utrecht University, The Netherlands.
27. WESLEY I.V., WELLS S.J., HARMON K.M., GREEN A., SCHROEDER-TUCKER L., GLOVER M. & SIDDIQUE I. (2000). Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1994–2000.

*
* *

N.B. : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la Campylobactériose (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).

CRYPTOSPORIDIOSE

RÉSUMÉ

*La cryptosporidiose est causée par des protozoaires parasites du genre *Cryptosporidium* dans lequel sont « validées » 18 espèces. Chez le bétail, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. baileyi*, *C. melagridis* et *C. galli* ont été déclarés comme responsables de morbidité et de foyers de la maladie. Une identification par le laboratoire est nécessaire pour confirmer le diagnostic. La cryptosporidiose à *Cryptosporidium parvum* provoque de la diarrhée chez le jeune mammifère non sevré, néanmoins, les animaux adultes et sevrés peuvent devenir également infectés. Les signes varient d'une infection modérée inapparente à une diarrhée sévère, et l'animal jeune, âgé ou immunodéprimé est plus sensible. La mortalité est faible. Les animaux sevrés et adultes n'expriment pas de signes de la maladie, mais excrètent des oocystes qui peuvent contaminer l'environnement. La cryptosporidiose à *Cryptosporidium andersoni* affecte les glandes digestives de l'abomasum du bétail adulte et des bovins plus âgés. Quelques animaux infectés présentent une baisse de poids mais ne développent pas de diarrhée. Les cryptosporidioses à *C. baileyi*, *C. melagridis* et *C. galli* sont des maladies d'oiseaux. *C. baileyi* affecte primitivement la bourse de Fabricius et le cloaque des galliformes, *C. melagridis* affecte l'iléon de la dinde, et *C. galli* infecte l'épithélium superficiel et glandulaire du proventricule des poules adultes et de certains oiseaux sauvages.*

Identification de l'agent pathogène : *il n'y a pas d'épreuve prescrite pour l'infection à *Cryptosporidium*. La démonstration d'oocystes des espèces de *Cryptosporidium* ou d'antigènes de *Cryptosporidium* au sein d'un échantillon correctement collecté et soumis, est suffisante pour un diagnostic. Le diagnostic est microscopique grâce aux techniques de Ziehl-Neelsen ou de phénol-auramine appliquées aux étalements de matières fécales concentrées ou non. Les méthodes microscopiques de détection des oocystes et les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) pour la détection des antigènes de *Cryptosporidium* sont relativement peu sensibles, mais suffisamment pour détecter les cas cliniques. Ni les techniques de coloration ou celles de fluorescence ne peuvent déterminer les espèces de cryptosporidies si les oocystes sont compris entre 4 et 6 µm. Ces méthodes peuvent détecter les oocystes chez l'animal malade, mais parfois ne sont pas suffisamment sensibles pour la détection chez l'animal cliniquement normal. Les épreuves de détection d'acide nucléique ont une plus grande sensibilité. La réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et le séquençage peuvent être utilisés pour déterminer quelques uns ou tous les espèces/génotypes ou sous-types de cryptosporidies. Ces systèmes de typage et de sous-typage utilisés pour les échantillons vétérinaires (ou humains) doivent aussi être utilisés pour les échantillons du milieu extérieur, afin d'éviter toute confusion due à l'utilisation de systèmes de recherche différents lors d'enquête sur les foyers ayant des implications en santé animale et publique. Cependant, la sensibilité des systèmes de sous-typage devra être améliorée pour pouvoir être utilisés avec des échantillons cliniques ou de l'environnement contenant un petit nombre (moins de 10) oocystes. La limitation des systèmes de sous-typage discriminants est essentiellement due au fait qu'ils ne sont applicables qu'à *C. parvum* et *C. hominis*. Des systèmes de sous-typage discriminants pour les agents non-*parvum* et non-*hominis* (ce qui comprend la majorité des agents pathogènes du bétail) doivent encore être mis au point.*

Les échantillons pour un premier diagnostic doivent être collectés au cours de l'infection aiguë et traités aussi rapidement que possible, idéalement dans les 24 h. Le transport au laboratoire doit

être en accord avec les recommandations de l'association internationale du transport aérien, résumées dans le Chapitre 1.1.1., « Prélèvement et expédition des échantillons pour le diagnostic ».

La mise en évidence des oocystes de cryptosporidies ou d'antigènes spécifiques dans l'échantillon fécal est le test le plus approprié pour de nombreuses applications. La plupart des infections responsables de morbidité et/ou de mortalité dans le bétail sont probablement dues à *C. parvum*. *Cryptosporidium bovis* est une espèce très fréquente qui infecte en premier lieu les veaux après le sevrage. Les cryptosporidies à *C. baileyi*, *C. meleagridis* et *C. galli* sont responsables de mortalité et/ou de morbidité chez les oiseaux d'élevage. Les espèces de cryptosporidies responsables peuvent être identifiées par PCR-RFLP et/ou séquençage de l'ADN d'oocystes de *Cryptosporidium*. Il n'y a pas de norme internationale pour la préparation d'oocystes purifiés, d'antisérums, d'antigènes, d'anticorps monoclonaux ou d'hybridomes bien que de nombreux kits de détection des oocystes purifiés et d'antigènes fécaux utilisant des anticorps monoclonaux soient disponibles dans le commerce.

Épreuves sérologiques : la cryptosporidiose est souvent une maladie du nouveau-né et à moins que l'exposition à des oocystes infectants soit exclue, les épreuves sérologiques n'offrent pas d'intérêt.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : il n'y a pas de programme de contrôle de la cryptosporidiose ni de vaccin rigoureusement testé et accepté de disponible.

A. INTRODUCTION

Historiquement décrit en 1907, *Cryptosporidium* spp. étaient considérés comme des commensaux jusqu'à ce que leur association avec la diarrhée chez de jeunes dindes (*C. melagridis*) dans les années 1950, et avec de grands foyers de diarrhée chez les bovins (*C. parvum*) dans les années 1970 soit reconnue. *Cryptosporidium* est un organisme pathogène important chez le bétail et chez l'homme et depuis les années 1980, la cryptosporidiose à *C. parvum* est reconnue comme une cause fréquente de gastro-entérite aiguë bénigne chez l'individu immunocompétent. Fayer (9) fournit un bon compte-rendu de la biologie de *Cryptosporidium*.

La cryptosporidiose est causée par des protozoaires parasites du genre *Cryptosporidium* (famille des *Cryptosporidiidae*, ordre des Eucoccidiorida, sous-classe des Coccidiasina, classe des Sporozoasida, phylum des Apicomplexa). Bien que plus de 20 espèces de ces coccidées aient été décrites sur la base de l'animal-hôte chez qui elles ont été isolées, la spécificité d'hôte comme critère de spéciation apparaît mal fondé puisque certaines espèces ont perdu une telle spécificité. La définition et l'identification des espèces du genre sont en changement permanent avec en plus de nouvelles espèces fondées sur des critères moléculaires. Actuellement, il existe 18 espèces validées (Tableau 1) : *C. hominis* trouvé principalement chez l'homme (antérieurement connu comme *C. parvum* de type 1), *C. parvum* trouvé chez l'homme et d'autres mammifères (antérieurement connu comme *C. parvum* de type 2), *C. andersoni* et *C. bovis* chez les bovins, *C. canis* chez le chien, *C. muris* chez la souris, *C. felis* chez le chat, *C. wrairi* chez le cobaye, *C. suis* chez le porc, *C. fayeri* chez le kangourou rouge (31), *C. macropodum* chez le kangourou gris (28), *C. meleagridis* chez la dinde et l'homme, *C. baileyi* chez le poulet, *C. galli* chez la poule adulte et certains oiseaux sauvages (26, 27), *C. varanii* chez les varans émeraude, *C. serpentis* chez les serpents et lézards et *C. molnari* chez le poisson (9). Chez les animaux de production, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. baileyi* et *C. meleagridis* ont été enregistrés comme agents de morbidité et de foyers de maladie.

Cryptosporidium bovis a été décrit récemment (10). Identifié auparavant comme le génotype B bovin de *Cryptosporidium* (GenBank AY120911), les oocystes de *C. bovis* ne sont pas distinguables morphologiquement des oocystes de *C. parvum* (Tableau 1). *C. bovis* est une espèce très fréquente qui infecte en premier lieu les veaux sevrés (10, 11). Les oocystes de *C. bovis* ne se sont pas révélés infectieux pour les souriceaux nouveau-nés BALBB/c ni pour 2 agneaux (moins de 1 semaine) infectés expérimentalement, mais a été infectieux pour 2 veaux infectés préalablement par *C. parvum*. *Cryptosporidium bovis* a été détecté chez des veaux âgés de 2 à 7 mois mais aucun n'avait de diarrhée ; *C. bovis* a aussi été détecté chez des agneaux âgés de 2 semaines.

En plus des 18 espèces validées, il existe plus de 40 génotypes de *Cryptosporidium* (9, 48). Certains seront probablement reconnus comme espèces au fur et à mesure que des recherches sont menées. Le génotype I de

Cryptosporidium des cervidés, de la mouflette, du tamia et les génotypes de *C. hominis* du singe (Tableau 2) ont été décrits chez l'homme. L'identification au laboratoire est indispensable pour confirmer le diagnostic.

Chez l'homme et l'hôte non-humain, les méthodes moléculaires incluant la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) et le séquençage de l'ADN ont révélé un plus grand éventail d'espèces que prévu initialement. *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. felis* et *C. suis* ont été décrits chez des patients immunocompétents et des patients immunodéprimés, ainsi que *C. hominis* et *C. parvum*. Les oocystes de *C. meleagridis* à partir de fèces humains purifiés sont indiscernables de ceux de *C. parvum* selon les méthodes classiques (décrites dans ce chapitre), mais montre une identité génétique avec *C. meleagridis* du dindon sur divers locus géniques séparés. Il existe des preuves que *C. andersoni* peut infecter les humains. Pour les humains, la menace zoonotique la plus significative provient de *C. parvum* et *C. meleagridis*.

La découverte de différences de séquences à l'intérieur de plusieurs gènes (ARN ribosomal [ARNr], protéine heat-shock 70 de *Cryptosporidium*, actine, protéine de la paroi des oocystes de *Cryptosporidium* [PPOC], protéines d'adhésion 1 et 2 apparentées à la thrombospondine) et entre des isolats individualisés par rapport aux espèces « validées antérieurement » entraîne la révision de la taxonomie du genre. Certains des 40 génotypes et plus de *Cryptosporidium* habituellement décrits pourraient représenter des espèces différentes (9, 48). La classification actuelle des génotypes de *Cryptosporidium* est donc sujette à changements.

Tableau 1. Quelques différences parmi les espèces du genre *Cryptosporidium*

Espèces de cryptosporidies	Dimensions moyennes de l'oocyste (µm) http://www.nmnh.si.edu/msw/	Lieu de l'infection	Hôte principal	Infectieux pour les humains
<i>C. hominis</i>	4,5 × 5,5	Intestin grêle	Humains	Oui
<i>C. parvum</i>	4,5 × 5,5	Intestin grêle	Bétail (nouveau-né), humains	Oui
<i>C. suis</i>	5,05 × 4,41	Intestin grêle	Porcs	Oui
<i>C. felis</i>	4,5 × 5,0	Intestin grêle	Chats	Oui
<i>C. canis</i>	4,95 × 4,71	Intestin grêle	Chiens	Oui
<i>C. meleagridis</i>	4,5 - 4,0 × 4,6 - 5,2	Intestine	Dindes	Oui
<i>C. muris</i>	5,5 × 7,4	Estomac	Rongeurs	Oui
<i>C. andersoni</i>	5,6 × 7,4 (5,0 - 6,5 × 8,1 - 6,0)	Estomac	Bovins	Non
<i>C. wrairi</i>	4,0 - 5,0 × 4,8 - 5,6	Intestin grêle	Cobayes	Non
<i>C. bovis</i>	4,7 - 5,3 × 4,2 - 4,8	Intestin grêle	Bétail	Non
<i>C. baileyi</i>	4,6 × 6,2	Trachée, bourse de Fabricius, cloaque	Volaille	Non
<i>C. fayeri</i>	4,5 - 5,1 × 3,8 - 5,0 (moyenne 4,9 × 4,3)	Intestin	Kangourou rouge (<i>Macropus rufus</i>)	Non
<i>C. macropodum</i>			Kangourou gris (<i>Macropus giganteus</i>)	Non
<i>C. galli</i>	8,0 - 8,5 × 6,2 - 6,4	Proventricule	Pinson, poulet	Non
<i>C. serpentis</i>	5,6 - 6,6 × 4,8 - 5,6	Estomac	Reptiles	Non
<i>C. varanii</i>	6,3 × 5,5	Intestin	(<i>Varanus prasinus</i>)	Non
<i>C. molnari</i>	4,72 × 4,47	Intestin	Poisson (Dorade royale)	Non
<i>C. scophthalmi</i>	3,7 - 5,0 × 3,0 - 4,7 (moyenne 4,44 × 3,91)	Intestin, très rarement l'estomac	Poisson (turbot)	Non

Pour de nombreuses espèces de *Cryptosporidium* du tableau 1, les dimensions et la forme des oocystes sont similaires. Cela rend très difficile, pour ne pas dire impossible, l'identification spécifique basée sur la morphométrie au microscope optique en raison du chevauchement des dimensions.

Tableau 2. Exemple de génotype de *Cryptosporidium* avec leur site d'infection et leur potentiel de transmission à l'homme

Génotypes de <i>Cryptosporidium</i>			
Intestinaux			
Ours	Cervidés* (×3)	Cerf	Apparenté au cerf
Souris sylvestre	Canard	Furet	Renard (×2)
Oie (×2)	Cheval	Marsupial (×2)	Mangouste
Singe*	Souris	Rat musqué (×2)	Opossum (×2)
Autruche	Mouton	Porc II	Lapin
Raton laveur	Phoque (×2)	Génotype nouveau du mouton (×2)	Moufflette*
Serpent	<i>C. canis</i> Coyote	<i>C. canis</i> chien	<i>C. canis</i> renard
Gastriques			
Caribou	Lézard	Tortue	Bécasse
<i>C. galli</i> (bouvreuril)	<i>C. muris</i> (génotype de la souris des champs japonaise)		

Légende : * infectieux pour les humains (données tirées des références 9, 47, 48).

1. Signes cliniques

La cryptosporidiose à *C. parvum* est à l'origine de diarrhée chez le bétail jeune non sevré ce qui comprend les veaux, les agneaux, les chevreaux et les alpagas. Les stades endogènes infectent les entérocytes de l'intestin grêle distal, le cæcum et le côlon. L'atrophie des villosités, le raccourcissement des microvillosités et la nécrose des entérocytes sont les modifications pathologiques majeures associées à cette maladie, et les animaux infectés retrouvent un état normal dans les 2 semaines. La diarrhée est le plus fréquemment observée chez le jeune, mais l'animal sevré ou adulte peut devenir infecté. Les signes varient d'une infection modérée ou inapparente chez les animaux les plus âgés, à une diarrhée sévère chez les jeunes. La mortalité est faible sauf en cas d'infections mixtes avec d'autres agents pathogènes entériques tels que les rotavirus. Les animaux adultes peuvent rester infectés et excréter des oocystes qui peuvent être transmis à d'autres sujets sensibles.

Les infections du bétail à *C. parvum* sont à l'origine de degrés variés d'abattement, de déshydratation, d'anorexie, de fièvre et de dégradation de l'état général. La mortalité peut être élevée. Elles provoquent rarement une déshydratation aiguë, un choc et une mortalité élevée comme ceux observés avec *Escherichia coli* entérotoxémique ou les rotavirus qui peuvent survenir en même temps. Les oocystes peuvent être détectés chez des hôtes malades et cliniquement sains. Les bovins en diarrhée et les brebis peuvent excréter entre 10⁶ et 10⁸ oocystes par gramme de matières fécales. Les bovins adultes infectés excrètent beaucoup moins d'oocystes, mais des infections subcliniques de bovins adultes peuvent générer des nombres d'oocystes similaires sur des périodes de 12 mois.

Cryptosporidium andersoni colonise les glandes digestives de l'abomasum du bétail adulte et des bovins plus âgés. Les microvillosités des glandes pepsiques sont détruites par les stades endogènes, qui peuvent entraîner des concentrations élevées de pepsinogène plasmatique détectable chez l'hôte infecté. Quelques individus infectés peuvent présenter une perte de poids en comparaison avec des animaux témoins. Le bétail infecté n'exprime pas de diarrhée mais peut excréter des oocystes pendant plusieurs mois.

Cryptosporidium est pathogène pour le poulet, la dinde et la caille, provoquant des maladies respiratoire et intestinale aboutissant à la morbidité et la mortalité. Habituellement, deux espèces (21) infectent le poulet et la dinde (*C. baileyi* et *C. meleagridis*) et une 3^e espèce non nommée infecte la caille (*Cryptosporidium* sp.). *Cryptosporidium* spp. sont à l'origine d'infections intestinales fréquentes chez le poulet de chair aux États-Unis d'Amérique (USA) et au Japon. La cryptosporidiose à *C. baileyi* est une maladie de l'épithélium de la bourse de

Fabricius et du cloaque du poulet bien que la trachée et la conjonctive soient des sites d'infection mais à un moindre degré. La cryptosporidiose à *C. baileyi* du poulet n'entraîne pas normalement de lésions graves ou de signes manifestes de la maladie. L'atrophie des villosités, le raccourcissement des microvillosités et l'élimination des entérocytes sont les modifications pathologiques majeures associées à la maladie. La cryptosporidiose respiratoire à *C. baileyi* du poulet peut entraîner une morbidité élevée et occasionnellement une mortalité. Initialement la maladie est associée à du renflement et de la toux suivis par une extension de la tête pour faciliter la respiration. La destruction des cils et l'hyperplasie, l'épaississement de la muqueuse et l'élimination d'un exsudat mucocellulaire dans les voies aérifères sont les modifications pathologiques majeures associées à la maladie du poulet de chair. Les symptômes sévères de la maladie respiratoire peuvent durer 4 semaines après l'infection (7). La cryptosporidiose à *C. baileyi* de la dinde est similaire à celle du poulet. Les isolats de *C. baileyi* du poulet peuvent infecter d'autres oiseaux.

La cryptosporidiose à *C. meleagridis* est une maladie iléale de la dinde et d'autres volailles et de l'homme. Elle peut provoquer une diarrhée sévère. L'atrophie des villosités, l'hyperplasie des cryptes et le raccourcissement des microvillosités sont les modifications pathologiques majeures associées à la maladie (7). La transmission d'isolat de *C. meleagridis* de la dinde au poulet et au canard domestique a été décrite.

La cryptosporidiose à *C. galli* est une maladie des poules adultes et de certains oiseaux sauvages ou exotiques (26, 27, 30). À la différence du cycle évolutif de *C. meleagridis* et de *C. baileyi*, les stades du cycle de *C. galli* sont limités aux cellules épithéliales du proventricule. L'examen histologique révèle la présence des parasites dans le proventricule (surface et épithélium glandulaire) (3, 26, 27, 30). Les oiseaux, la tête maintenue sous l'aile, présentent un plumage ébouriffé, une réponse excessive aux stimuli extérieurs et un arrêt de la croissance (30). L'examen histologique de coupes de caille colorées à l'hémalum-éosine révèle une nécrose et une hyperplasie des cellules de l'épithélium glandulaire du proventricule, et une infiltration par des cellules inflammatoires dans la lamina propria du proventricule associée à un nombre élevé d'oocystes de *Cryptosporidium* fixés à la surface des cellules épithéliales glandulaires (30). Les oocystes de *C. galli* (8,0–8,5 × 6,2–6,4 µm) sont plus grands que ceux de *C. baileyi*.

Des cryptosporidioses respiratoires et intestinales ont été signalées chez la caille élevée industriellement due à une espèce non parfaitement décrite (*Cryptosporidium* sp.) dont les oocystes sont plus petits que ceux de *C. baileyi* et ne sont pas infectants pour le poulet et la dinde. Les modifications pathologiques sont similaires à celles décrites pour les cryptosporidioses respiratoires et intestinales du poulet à *C. baileyi* (7).

2. Dose infectante

La dose infectante pour *C. parvum* varie d'un isolat à un autre et d'une espèce-hôte à une autre. Pour les nouveau-nés de souris (souche CD-1), la dose moyenne infectante (DI₅₀) est entre 87 et 60 oocystes (19). Dix oocystes ont provoqué une infection chez deux primates testés et 5 oocystes ont produit une maladie clinique chez des agneaux gnotobiotiques. La dose infectante pour les bovins n'est pas connue bien que l'on pense qu'elle est petite. Le fait que des isolats de *C. parvum* puissent ou non coloniser différentes espèces hôtes est inconnu. Chez des humains adultes sains volontaires, la dose DI₅₀ est aussi dépendante de l'isolat et du statut immunitaire de l'hôte. Dans des études d'infection chez des humains volontaires, les isolats de *C. parvum* diffèrent dans leurs doses DI₅₀, leurs taux d'attaque et la durée de la diarrhée induite. La dose DI₅₀ de l'isolat UCP de *C. parvum* (Ungar *Cryptosporidium parvum*, issu de l'homme, de la part du Dr B. Ungar, USA) est de 1042 oocystes, celle de l'isolat IOWA (issu des bovins, de Ames, Iowa, USA) est de 132 oocystes et celle de l'isolat TAMU (issu du cheval, de Texas A&M Université, USA) est de 9 oocystes (25). L'infection orale avec 100 oocystes de *C. baileyi* peut entraîner une cryptosporidiose intestinale (7).

3. Transmission

La transmission peut se réaliser par toute modalité au cours de laquelle peut être ingéré du matériel contaminé par des oocystes excrétés par des individus infectés. Les modalités augmentant la propagation de la cryptosporidiose sont le vêlage et l'agnelage en bâtiment, l'alimentation en lots, l'élevage des nouveau-nés quand les jeunes animaux sensibles sont en contact étroit les uns avec les autres et avec les fèces d'animaux infectés. De la même façon, l'élimination des fèces, du fumier dans la cour de ferme ou d'autres déchets contaminés dans des zones d'épandage suivie par des périodes fortes pluies ou de neige fondue peut conduire à la contamination des cours d'eau par des oocystes de *C. parvum*. Ces cours d'eau peuvent être utilisés comme source d'eau buvable pour d'autres animaux ou comme eau potable pour la consommation humaine. Les déchets contaminés incluent à la fois les produits solides et liquides de l'élevage animal.

4. Maintien de l'infection

Une variété de mammifères sauvages joue le rôle d'hôtes pour *C. parvum* (9, 39, 43, 47), en particulier les nouveaux nés, mais peu de choses sont connues quant à l'importance de leur implication dans la transmission de l'infection et le maintien de celle-ci chez les espèces domestiques élevées dans les conditions d'une ferme. Leur rôle dans l'épidémiologie pour les espèces domestiques est aussi incertain. Les méthodes utilisées pour diagnostiquer l'infection chez les petits animaux et la faune sont les mêmes que celles décrites pour les animaux de ferme. Les oocystes sont résistants dans l'environnement et peuvent survivre pendant longtemps (> 6 mois) dans des conditions d'humidité et de chaleur. La transmission de la cryptosporidiose des brebis cliniquement normales aux agneaux qui têtent est démontrée, mais la durée du statut d'animal porteur reste inconnue. Une variété d'oiseaux constitue les hôtes de *C. baileyi*.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Il n'existe d'épreuve diagnostique recommandée pour la cryptosporidiose. La mise en évidence d'oocystes d'espèces de *Cryptosporidium* ou d'antigènes dans un échantillon correctement réalisé et manipulé est suffisante pour un diagnostic et les méthodes de choix pour la réalisation des échantillons sont non invasives. Comme il n'existe pas de techniques de culture *in vitro* reproductible et disponible pour amplifier les parasites avant leur identification, la mise en évidence des oocystes (stades de transmission), des antigènes de *Cryptosporidium* et/ou de l'ADN à partir des fèces ou de liquides corporels appropriés est donc la méthode de choix. En plus de ces épreuves, la coloration à l'hématoxyline-éosine peut être utilisée pour la confirmation histologique du diagnostic *post mortem*. Cette méthode de coloration histologique est utilisée couramment dans le monde pour confirmer le diagnostic, et ne sera pas décrite dans ce chapitre.

Des analyses supplémentaires comprenant l'identification des espèces et/ou du sous-type de *C. parvum* peuvent être réalisées sur l'ADN en utilisant des techniques moléculaires comme la PCR-RFLP et/ou le séquençage de produits amplifiés à partir de locus identifiés. Ceci non seulement confirme le diagnostic mais permet également de dépasser ce qu'il est possible d'obtenir avec la morphologie et la morphométrie au microscope optique.

Pour les espèces de cryptosporidies infectant le tube digestif (tableau 1), le diagnostic premier est fondé sur la mise en évidence des oocystes dans les fèces par des colorations classiques ou (immuno)fluorescentes ainsi que celle des antigènes fécaux (copro-antigènes) par une méthode immuno-enzymatique (ELISA) ou par des méthodes immuno-chromatographiques. La majorité des méthodes diagnostiques ont été développées pour *C. parvum* à cause de son importance commerciale et de sa disponibilité. De façon anecdotique, dans une minorité de cas, les méthodes décrites ci-dessous peuvent ne pas détecter tous les isolats. On peut compter sur ces méthodes pour détecter la plupart des infections à *C. parvum*, mais leur recours pour les espèces autres que *C. parvum* à partir de prélèvements est moins bien appréhendé.

La mise en évidence d'oocystes de cryptosporidies ou d'antigènes spécifiques dans des prélèvements fécaux est le test le plus approprié pour la plupart des applications. La plupart des infections qui provoquent une morbidité et/ou une mortalité chez les mammifères sont vraisemblablement dues à *C. parvum*. Les espèces de cryptosporidies responsables peuvent être déterminées par PCR-RFLP ou par séquençage de l'ADN isolé à partir des oocystes. Il n'existe pas de méthodes normalisées internationalement pour la préparation d'oocystes purifiés, des antisérums, des antigènes, des anticorps monoclonaux (AcM) ou des hybridomes bien qu'un certain nombre de kits de détection d'oocystes ou d'antigènes fécaux utilisant des AcMs soient disponibles dans le commerce.

a) Diagnostic de laboratoire

Les éléments du diagnostic des oocystes de *C. parvum* observés en suspension et en utilisant la microscopie par interférence différentielle de Nomarski sont les suivants. Les oocystes sont lisses, à paroi épaisse, incolores, renfermant de petits éléments ovoïdes ou sphériques et quand ils ont évolué (sporulés), 4 sporozoïtes nus [c'est à dire non contenus dans un sporocyste], allongés et un reliquat cytoplasmique. Les dimensions moyennes de l'oocyste de *C. parvum* sont de $4,5 \times 5 \mu\text{m}$ (échelle 4 à $6 \mu\text{m}$).

Le diagnostic est normalement établi par les méthodes microscopiques conventionnelles ; les méthodes de Ziehl-Neelsen modifiée (mZn) ou à base d'auramine-phénol (AP) sur des étalements fécaux après concentration sont fréquemment utilisées (5, 6, 32, 37). Les solutions sucrées (solution de Sheather), salées, à base de sulfate de zinc ou de formaldéhyde, ou des techniques spécifiques comme la séparation immuno-magnétique, sont les meilleures options pour concentrer les oocystes fécaux (32, 33, 37).

b) Mise en évidence dans les fèces

Les échantillons fécaux de la plupart des cas cliniques renferment de grandes quantités d'oocystes à paroi épaisse et suffisamment d'antigènes de cryptosporides, pour que l'utilisation de colorations standards et de techniques immunologiques puissent donner un diagnostic positif. L'importance des excréteurs cliniquement sains n'est pas connue et du fait de la faible sensibilité des méthodes conventionnelles, les excréteurs de petites quantités d'oocystes peuvent ne pas être diagnostiqués par les techniques conventionnelles car le nombre d'oocystes peut être inférieur à la limite de détection de ces techniques (37, 41, 42). Chez les animaux malades, les oocystes peuvent être mis en évidence par des étalements de matières fécales sans enrichissement. L'utilisation d'une méthode de concentration peut augmenter le rendement. Les deux méthodes, flottation et sédimentation, sont fiables pour la concentration des oocystes de cryptosporidies et les antigènes oocystaux peuvent encore être mis en évidence en suivant les procédures de concentration des oocystes.

Les oocystes peuvent ne pas être détectés dans les échantillons cliniques de tous les cas de cryptosporidiose et l'absence répétée d'oocystes dans des échantillons à partir d'hôtes cliniquement malades ne signifie pas obligatoirement l'absence d'infection. Dans ces cas, et notamment lorsque la suspicion clinique est forte, des échantillons fécaux négatifs pour les oocystes doivent être soumis à la détection des antigènes et/ou à une PCR, car les antigènes ou l'ADN de *Cryptosporidium* seront présents dans les fèces (37), ce qui constitue le grand avantage de la détection des copro-antigènes par des méthodes immunologiques. Les épreuves de détection d'acide nucléique comme la PCR sont de plus en plus utilisées parce qu'elles offrent une sensibilité accrue et une identification de l'espèce/génotype/sous-type. Les techniques PCR (la PCR nichée est plus sensible que la PCR directe) sont vraisemblablement les meilleurs outils diagnostics (37).

Les échantillons fécaux positifs en cryptosporidies devraient être analysés par des personnels familiarisés avec les techniques de coloration et de concentration et des étalements de ces échantillons devraient être entrepris à chaque étape du test. Les échantillons fécaux renfermant des oocystes de *C. parvum* peuvent être conservés au froid à 4 °C soit dans le bichromate de potassium à 2,5 % ($K_2Cr_2O_7$) soit dans le formol. De la même façon, les étalements fécaux positifs en oocystes, séchés à l'air et fixés au méthanol peuvent être préparés en avance à partir d'échantillons positifs pour servir de témoins. Quand l'implication de l'appareil bronchopulmonaire est suspectée, des tests similaires peuvent être entrepris sur les exsudats ou les liquides de lavages bronchiques ou pleuraux.

À noter que le $K_2Cr_2O_7$ à 2,5 % peut inhiber la PCR. Les échantillons positifs en oocystes ou les oocystes partiellement purifiés conservés dans le $K_2Cr_2O_7$ à 2,5 % pour une analyse PCR doivent être rincés dans de l'eau désionisée pour éliminer le reliquat de $K_2Cr_2O_7$ avant l'extraction d'ADN. Une série de 3 rinçages chacun suivie d'une centrifugation (3 000 *g* pendant 10 min), l'élimination du surnageant et la remise en suspension du culot dans de l'eau désionisée devraient minimiser l'inhibition de la PCR. Il convient de noter que des facteurs inhibants peuvent être présents même après une longue conservation (plus de 6 mois).

c) Sécurité de l'équipe du laboratoire et des opérateurs

Les cryptosporides appartiennent au groupe de risque 2 pour les laboratoires et toute manipulation effectuée au laboratoire qui peut donner lieu à des aérosols infectants doit être conduite dans un local de sécurité. Les échantillons pour recherche de cryptosporidies peuvent contenir d'autres organismes pathogènes et doivent être traités en conséquence. Pour sauvegarder la santé des techniciens de laboratoire, la procédure de sécurité, définie dans le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries », doit être respectée.

Le laboratoire doit avoir une assurance qualité interne et externe en place comme indiquée dans le Chapitre 1.1.3., « Gestion de la qualité dans les laboratoires de diagnostic vétérinaire ».

d) Conservation et soumission des échantillons

Quand cela est possible, les échantillons pour diagnostic doivent être réalisés au cours de l'infection aiguë et traités aussi tôt que possible. Idéalement, le transport des échantillons doit assurer leur arrivée au laboratoire dans les 24 h. Si un examen rapide de recherche de cryptosporidies ne peut être réalisé, la dégradation de la morphologie du protozoaire ainsi que leur envahissement par d'autres micro-organismes, en particulier des levures, peuvent être limités par l'addition de formol à 10 % (v/v), bien que le formol puisse interférer avec l'analyse PCR. Les deux, l'identification morphologique des oocystes et l'analyse de l'ADN du sporozoïte par PCR, peuvent être préservées pendant longtemps à 4 °C sans addition de formol. Les fèces peuvent être conservés congelés pendant plus de 2 ans sans perte de la possibilité d'extraire l'ADN pour les techniques moléculaires. Dans certains cas, cette conservation peut même améliorer l'extraction de l'ADN de *Cryptosporidium* en raison, peut-être, de l'assouplissement de la paroi externe des oocystes. En revanche, une série de congélations-décongélations n'est pas recommandée car cela risque de dégrader l'ADN extrait.

Les procédures utilisées pour la conservation et le transport des échantillons sont importantes pour la qualité des analyses de laboratoire. Les échantillons doivent être collectés dans un container à l'épreuve de l'eau puis dans un double emballage de sécurité. Les procédures pour l'emballage et l'envoi des échantillons doivent respecter les règlements de l'Association Internationale du Transport Aérien (AITA/IATA) concernant les biens dangereux (16). Ces règlements sont résumés dans le Chapitre 1.1.1., « Prélèvement et expédition des échantillons pour le diagnostic ».

e) Seuil de détection dans les matières fécales

La plupart des méthodes de détection des oocystes par coloration et fluorescence, ainsi que les ELISAs ou les méthodes immuno-chromatographiques (IC) pour celle des antigènes de cryptosporidies sont relativement peu sensibles. Ces méthodes peuvent détecter les oocystes chez l'animal malade, mais ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter l'infection chez l'animal asymptomatique. Anusz *et al.* (2) indiquent une limite de détection de 10^6 oocystes/ml de fèces en utilisant la méthode modifiée de Kinyoun de mZn sur des étalements de fèces non concentrées. La concentration des oocystes dans l'échantillon peut augmenter la sensibilité de la détection. Dans les échantillons de fèces humaines positives en oocystes, il est nécessaire d'avoir entre 10^4 et 5×10^4 oocystes/g de fèces non concentrées pour obtenir par cette méthode une efficacité de 100 % de détection (41). Les variations de consistance des fèces influent sur la facilité de détection, avec plus de facilité dans des concentrés provenant de matières très liquides ou diarrhéiques que de matières formées (41). En plus des techniques microscopiques, un certain nombre d'ELISAs à capture d'antigène et de méthodes IC a été rapporté dans la littérature avec des limites de détection dans les 3×10^5 à 10^6 oocystes/ml (2, 29, 37), indiquant ainsi ne pas fournir une sensibilité supérieure à celle des méthodes microscopiques.

Dans les échantillons fécaux de bovins, les oocystes ne sont pas détectés dans les échantillons ensemencés avec 10 000 oocystes de *C. parvum* par g en suivant la sédimentation en formol-éther et l'examen en utilisant de l'AP ou l'immunofluorescence (IF). Quand la concentration est obtenue avec la flottation par le sucre, le seuil de détection est de 4 000 oocystes/g pour les deux méthodes. Après la flottation par solution saline, il est possible de détecter 4 000 oocystes/g par la coloration AP, mais la limite de détection est portée à 6 000 oocystes/g en utilisant l'IF (41). Webster *et al.* (42) comparent également la microscopie et la PCR et trouvent que la PCR en association avec la séparation immunomagnétique des oocystes de l'échantillon fécal détecte 5 oocystes/ml de fèces diluées, ce qui correspond à 80-90 oocystes/g. Même après la dilution des fèces requise pour la séparation immunomagnétique, ceci représente une augmentation de la sensibilité de plusieurs ordres de grandeur par rapport aux méthodes conventionnelles de diagnostic coproscopique. Actuellement, sont disponibles plusieurs tests basés sur la PCR (voir section B.1. Méthode de reconnaissance des acides nucléiques).

• Préparation d'étalements fécaux non concentrés (ou de tout liquide approprié) en incluant un témoin positif à chaque fois que la procédure est exécutée

• Protocole

- i) Porter des vêtements de protection et des gants jetables. Marquer le numéro de référence de l'échantillon sur la lame porte-objet avec une pointe de diamant¹, et utiliser des lames pour examen microscopique propres à chaque échantillon. Déposer une goutte de solution physiologique (50 µl) au centre de la lame ;
- ii) Prendre un petit échantillon de fèces (environ 2 mg) avec l'extrémité d'une baguette² (ou d'une pipette si les fèces sont liquides) et émulsifier l'échantillon dans la solution en mélangeant. Pour des fèces liquides (ou un liquide corporel approprié), déposer une goutte directement sur la lame. Pour les fèces liquides, le mucus, les exsudats ou le pus peuvent être mélangés avec la solution sur la lame porte-objet. Les fèces liquides peuvent être diluées avec une goutte de solution physiologique à 150 mM ;
- iii) Pratiquer un étalement d'épaisseur variable (de moyenne à épaisse). S'assurer que l'étalement est d'une transparence correcte³ ;
- iv) Sécher la préparation à la température de la pièce ;
- v) Fixer l'étalement⁴ dans le méthanol pendant 3 min.

1 À défaut, un crayon à mine de plomb peut être utilisé pour marquer la portion dépolie de la lame porte-objet.

2 Pour des selles formées, l'échantillon doit comprendre des prélèvements de surface et de l'intérieur du prélèvement.

3 Une épaisseur modérée est recommandée. Si l'étalement est trop épais ou trop mince, les oocystes peuvent passer inaperçus. Une épaisseur acceptable peut être obtenue si les aiguilles d'une montre ou les caractères d'imprimerie de cette page peuvent être vus au travers de la préparation.

4 Les étalements séchés à l'air et fixés au méthanol peuvent être conservés à la température de la pièce pendant au moins 6 mois avant coloration.

f) Préparation d'étalements fécaux (ou de liquide corporel approprié) après concentration par flottation ou sédimentation

Aucune méthode de flottation ou de sédimentation n'est spécifique pour les oocystes de cryptosporidies. Les liquides de flottation sont de densité plus élevée que les parasites à concentrer et sont préparés selon une densité définie en utilisant un hydromètre fiable disponible dans la plupart des fournisseurs de laboratoire. Les parasites concentrés par des méthodes de flottation ou de sédimentation peuvent être identifiés par toutes les méthodes décrites dans ce chapitre. Les liquides de flottation/sédimentation peuvent parfois interférer avec les épreuves de diagnostic. Un excès en saccharose peut réduire à la fois la fixation des oocystes à la lame et celle des anticorps, une exposition prolongée au NaCl peut altérer la morphologie et la morphométrie, et le formol peut réduire la sensibilité des réactions PCR. Quand les oocystes sont concentrés, l'excès en liquide de flottation/sédimentation peut être éliminé en rinçant le concentré dans de l'eau et en recentrifugeant. Le surnageant est ensuite aspiré et jeté et le plus grand soin est apporté à ne pas troubler le milieu. Ces méthodes de concentration sont fiables pour tout liquide corporel qui pourrait contenir des oocystes.

1. Flottation

Le principe de flottation utilise un milieu liquide qui est plus dense que les oocystes à concentrer. Ainsi, quand ils sont mélangés au liquide, les oocystes remontent à la surface, peuvent être récoltés à partir de la surface et détectés selon une méthode appropriée. Pour un liquide de flottation utilisable en diagnostic, lorsque la morphologie et la morphométrie sont les facteurs limitants, le milieu de suspension ne doit pas seulement être plus lourd que l'objet flottant mais doit ne pas produire de rétraction qui rendrait l'objet méconnaissable (32). Les méthodes de flottation par le saccharose, le sulfate de zinc et le sel en saturation sont toutes fiables pour la concentration des oocystes de cryptosporidies. Ce qui suit est la description des méthodes utilisées pour préparer des solutions de flottation et pour concentrer les oocystes.

- **Flottation au saccharose**

La solution de sucre (densité spécifique de 1,18) est préparée dans un récipient en verre en additionnant 256 g de saccharose à 300 ml d'eau désionisée. La solution est chauffée modérément (< 60 °C) et agitée continuellement par un agitateur magnétique sur une plaque jusqu'à ce que le sucre soit dissous complètement. La solution de saccharose est soit placée dans de la glace soit au réfrigérateur jusqu'à obtenir une température de 4 °C. La solution refroidie de saccharose est transférée dans une éprouvette de 500 ml et sa densité spécifique est ajustée à 1,18 en ajoutant la quantité suffisante d'eau désionisée (4 °C). La solution est transférée dans un récipient en verre à bouchon vissé, étiqueté, daté, identifié et conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation.

- **Flottation au sulfate de zinc**

La solution au sulfate de zinc (densité spécifique de 1,18) est préparée en ajoutant, dans un récipient en verre, 100 g de sulfate de zinc à 300 ml d'eau désionisée. La solution est modérément chauffée (< 60 °C) et agitée continuellement par un agitateur magnétique sur une plaque jusqu'à ce que le sel soit dissous complètement. La solution de sulfate de zinc est transférée dans une éprouvette de 500 ml et sa densité spécifique est ajustée à 1,18 en ajoutant la quantité suffisante d'eau désionisée (4 °C). La solution est transférée dans un récipient en verre à bouchon vissé, étiqueté, daté, identifié et conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation.

- **Flottation au chlorure de sodium**

La solution au chlorure de sodium (densité spécifique de 1,2) est préparée en ajoutant 200 g de chlorure de sodium à 200 ml d'eau désionisée. La solution est modérément chauffée (< 60 °C) et agitée continuellement par un agitateur magnétique sur une plaque jusqu'à ce que le sel soit dissous complètement. De petites quantités de sel sont ajoutées (approximativement 10 g) toutes les 10 min jusqu'à ce que la solution soit saturée. La solution est ensuite décantée dans un récipient en verre soit placé dans la glace soit dans un réfrigérateur jusqu'à ce que la température soit ajustée à 4 °C. La solution refroidie saturée est ensuite transférée dans une éprouvette de 500 ml et sa densité spécifique est ajustée à 1,2 en ajoutant la quantité suffisante d'eau désionisée (4 °C). La solution est transférée dans un récipient en verre à bouchon vissé, étiqueté, daté, identifié et conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation.

La saumure est une solution aqueuse concentrée en NaCl qui a une densité spécifique entre 1,12 et 1,2 selon le degré de pureté du sel utilisé. Fiable pour la concentration des oocystes de cryptosporidies, quelques kystes de protozoaires peuvent être fortement « ratatinés » ou vidés dans le liquide de flottation. Le temps optimal pour examiner les échantillons obtenus à partir d'une flottation en saumure est entre 5 et 20 min après leur récolte en flottation.

La flottation centrifuge a été utilisée pour récolter des oocystes de cryptosporidies (et d'autres kystes et œufs) à partir des fèces. La plupart des méthodes de flottation sont fondées sur les modifications de la

technique de Clayton-Lane où les oocystes sont concentrés par flottation et récoltés en gardant la goutte sur la face inférieure de la lamelle couvre-objet placée sur le ménisque du liquide de flottation. La centrifugation est utilisée pour séparer les éléments qui sont plus denses que le liquide des oocystes et des éléments qui flottent en surface du liquide de flottation. L'inclusion d'une étape de centrifugation accélère la séparation des oocystes des autres éléments (et par conséquent la concentration des oocystes) et minimise les risques d'effet du liquide sur la morphométrie ou la morphologie des oocystes. L'opérateur devra noter les questions en rapport avec la santé et la sécurité, en incluant les blessures et les piqûres associées à la manipulation des lames.

Concentration des oocystes de cryptosporidies par flottation

- **Protocole**

- Porter des vêtements de protection et des gants jetables. Transférer approximativement 1 à 2 g de fèces⁵, avec une baguette mélanger 3 ml de liquide flottation dans un tube à essais de 12 ml. Si les fèces sont liquides, mélanger, distribuer approximativement 1 à 2 ml de liquide dans le tube à essais ;
- Ajouter en agitant doucement suffisamment du liquide de flottation pour former un ménisque à l'extrémité du tube. Éliminer tout élément de grande dimension de la surface et si nécessaire, rajouter du liquide pour maintenir le ménisque ;
- Laisser 20 min, puis prendre grand soin de ne pas détruire le ménisque, le recueillir avec une pipette et le déposer sur une lame porte-objet⁶ ;
- Sécher à l'air et à la température de la pièce ;
- Fixer l'étalement⁷ au méthanol pendant 3 min.

Concentration des oocystes de cryptosporides par flottation – centrifugation

- **Protocole**

- Porter des vêtements de protection et des gants jetables. Transférer approximativement 1 à 2 g de fèces⁸, avec une baguette mélanger 3 ml de liquide flottation dans un tube à essais de 12 ml. Si les fèces sont liquides, mélanger, distribuer approximativement 1 à 2 ml de liquide dans le tube à essais ;
- Ajouter en agitant doucement suffisamment du liquide de flottation pour former un ménisque à l'extrémité du tube. Éliminer tout élément de grande dimension de la surface et si nécessaire, rajouter du liquide pour maintenir le ménisque ;
- Placer le tube à centrifuger dans une centrifugeuse à godets, placer une lamelle de 22 × 22 mm à l'extrémité supérieure du tube de sorte qu'il touche le ménisque. Équilibrer avec la balance si nécessaire, centrifuger à 1 100 **g**⁹ pendant 5 min ;
- Une fois la centrifugeuse arrêtée, saisir la lamelle et la déposer sur une lame porte-objet. Une goutte doit être présente sous la face inférieure de la lamelle. Faire attention à garder cette goutte lors du dépôt de la lamelle sur la lame.

2. Sédimentation - Centrifugation

Les parasites seront plus rapidement déposés si la suspension fécale est soumise à centrifugation, néanmoins, des particules alimentaires sédimenteront également plus vite et pourront masquer la présence de parasites dans la partie examinée. Pour surmonter ce problème, les plus grandes particules alimentaires peuvent être éliminées avant la centrifugation en filtrant les fèces émulsifiées au travers d'un tamis dont la dimension permettra le passage des parasites mais retiendra les particules alimentaires. Comme ce procédé est plus efficace que la sédimentation par gravité, un plus petit échantillon fécal (500 mg à 1 g, les dimensions d'un pois) est suffisant. Bien que la centrifugation concentre le matériel plus rapidement, des débris fécaux, qui peuvent cacher des parasites, restent présents. L'efficacité de la détection est augmentée en ajoutant du formol pour la fixation et la conservation des parasites et de l'éther pour éliminer les matières grasses. Le formol et l'éther à 10 % sont bactéricides. Après centrifugation, un bouchon gras, qui peut adhérer aux parois internes du

5 Pour des selles formées, l'échantillon doit inclure des éléments de surface et de l'intérieur du prélèvement.

6 Une épaisseur modérée est recommandée. Si l'étalement est trop épais ou trop mince, les oocystes peuvent passer inaperçus. Une épaisseur acceptable peut être obtenue si les aiguilles d'une montre ou les caractères d'imprimerie de cette page peuvent être vus au travers de la préparation.

7 Les étalements séchés à l'air et fixés au méthanol peuvent être conservés à la température de la pièce pendant au moins 6 mois avant coloration.

8 Pour des selles formées, l'échantillon doit inclure des éléments de surface et de l'intérieur du prélèvement.

9 Une centrifugation à une vitesse supérieure à 1 100 **g** ou des périodes > 5 min n'est pas conseillée car certains parasites seront déformés ou déchirés.

tube, peut être observé à l'interface des deux liquides. La couche d'éther, le bouchon de graisse et le formol situé en dessous sont jetés et le culot complet est gardé pour examen.

Plusieurs modifications de cette procédure ont été recommandées et le protocole suivant est typique de la méthode utilisée dans les laboratoires de diagnostic. Avec cette méthode, les kystes de protozoaires sont moins déformés qu'avec la flottation au sulfate de zinc. Cette méthode permet d'obtenir une concentration de 15 à 50 fois selon le parasite recherché et procure un bon enrichissement de kystes de protozoaires et d'œufs d'helminthes qui sont reconnus de façon satisfaisante. Toutes les étapes qui peuvent générer des aérosols (à l'exception de la centrifugation), doivent être effectuées dans un local de protection et de sécurité.

Concentration d'oocystes de cryptosporidies par sédimentation/centrifugation (formol/éther)

• Protocole

- i) Porter des vêtements de protection et des gants jetables. Transférer approximativement 500 mg à 1 g de fèces¹⁰, avec une baguette¹¹ dans un tube à centrifugation de 12 à 15 ml, contenant 7 ml de formol à 10 %. Si les fèces sont liquides, verser environ 750 µl dans le tube à centrifuger ;
- ii) Agiter le prélèvement vigoureusement et émulsifier à l'aide de la baguette ;
- iii) Filtrer la suspension au travers d'un tamis dans un récipient, puis verser le matériel filtré de nouveau dans le tube à centrifuger¹² ;
- iv) Ajouter 3 ml d'éther (ou acétate d'éthyle¹³) à la solution formolée, sceller l'extrémité du tube avec un bouchon de caoutchouc (ou avec le pouce protégé par un gant apposé à l'extrémité) et agiter le mélange vigoureusement pendant 30 s. Retourner le tube plusieurs fois durant cette manipulation et laisser échapper un peu d'air en retirant le bouchon (ou le pouce) lentement ;
- v) Centrifuger le tube à 1 100 *g*¹⁴ pendant 2 min ;
- vi) Éliminer le bouchon de graisse avec une baguette en bois en passant cette baguette entre le bouchon et la face interne du tube. Éliminer le bouchon et le liquide placé au-dessus et en-dessous de lui en renversant le tube, permettant seulement à ce dernier ou quelques gouttes de retomber dans le tube. Éliminer ce liquide renfermant l'éther et le formol dans un récipient identifié apte à recueillir les liquides et pouvant être re-fermé ;
- vii) Remettre en suspension le culot¹⁵ par agitation. Verser la totalité ou la plus grande quantité du culot remis en suspension sur la lame porte-objet ou le faire avec une pipette, sécher à l'air.

Un dispositif commercialisé pour concentrer les œufs d'helminthes, les larves, les kystes et oocystes de protozoaires en utilisant la méthode formol-éther est disponible. Vendu comme Concentrateur de Parasites Fécaux¹⁶, il s'agit d'un système présentant 2 tubes en polypropylène, l'un avec bouchon utilisé pour émulsifier le prélèvement, l'autre conique pour la centrifugation avec un bouchon adapté. La méthode est telle que les échantillons fécaux frais ou conservés (formol 10 %, merthiolate-iode-formol, alcool, formol-acétate de sodium) peuvent être utilisés.

g) Méthodes classiques de coloration

Les deux méthodes mZN et AP sont efficaces pour détecter les oocystes fécaux de cryptosporidies (5, 6, 32, 37). Les lames colorées par mZn doivent être examinées sous l'objectif ×40 et les oocystes suspects doivent être mesurés et confirmés sous l'objectif ×100 (morphologie et morphométrie) en utilisant un oculaire de ×10 d'un microscope optique. Les lames colorées par AP nécessitent d'être lues par un microscope à épifluorescence équipé d'un filtre à isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (excitation 490 nm ; émission 510 nm). Un filtre à UV (excitation 355 nm, émission 450 nm) peut aider à la visualisation des sporozoïtes colorés par AP. Les lames colorées par AP peuvent être lues sous objectif de ×20 et les oocystes à morphologie typique confirmés sous objectif de ×40. Celui de ×100 doit être utilisé pour les

10 Ce sont les dimensions d'un pois.

11 Pour des selles formées, l'échantillon doit inclure des éléments de surface et de l'intérieur du prélèvement.

12 425 µm de dimensions des mailles, 38 mm de diamètre est équivalent à 36 mailles British Standard (BS 410-86) ou 40 mailles American Standard (ASTM E11-81). Le contour du filtre doit correspondre étroitement avec le bord du récipient. Les débris piégés par le filtre sont éliminés en retournant le tamis et en le passant sous un fort jet d'eau. Le tamis et le récipient sont lavés au jet d'eau entre chaque analyse.

13 L'acétate d'éthyl bien que moins inflammable que l'éther-diéthyl est néanmoins inflammable, aussi la procédure doit-elle être effectuée dans un local bien ventilé, en s'assurant qu'il n'abrite aucune flamme. Éviter de respirer trop longtemps et tout contact avec la peau.

14 Une centrifugation à une vitesse supérieure à 1 100 *g* ou des périodes > 5 min n'est pas conseillée car certains parasites seront déformés ou déchirés.

15 Un culot trop volumineux est indicatif de l'un des deux faits suivants : centrifugation supérieure à la vitesse (ou au temps) recommandée, agitation insuffisante (étape iv).

16 PC, Evergreen Scientific, 2300 East 49th Street, P.O. Box 58248, Los Angeles, California 90058, USA; <http://www.evergreensci.com/micro/hfpc.htm>.

mesures (morphométrie). Les oocystes colorés par AP observés soit sous FITC ou filtre à UV peuvent être mesurés en augmentant légèrement le voltage (faible intensité) ou la source lumineuse de telle sorte que les images en optique et en fluorescence peuvent être observées simultanément. L'élément peut alors être mesuré avec l'oculaire gradué.

- **Calibrage en utilisant l'oculaire et le micromètre**

La diagnose des organismes intacts nécessite souvent d'enregistrer les mesures et la forme (morphométrie) de l'organisme en question, pour s'assurer qu'elles tombent dans la fourchette acceptée des paramètres standards (ex. dimensions et forme) de l'espèce en cause. Avec un microscope optique, la mesure des objets de < 1 mm est obtenue grâce à un micromètre-objet (vernier) en association avec un oculaire micrométrique. Les éléments sont mesurés selon les unités du Système International et l'unité de base de mesure en microscopie optique est le micron ($\mu = 0,001$ mm).

Le micromètre-objet consiste en une lame de verre de 76 × 26 mm avec une échelle millimétrée, graduée en microns et montée en permanence. L'oculaire micrométrique est un disque en plastique ou en verre transparent portant une échelle graduée qui est placée sur un des oculaires du microscope binoculaire. L'échelle habituelle est de 1 cm de longueur divisée en intervalles en millimètres. Quand le microscope est centré sur un objet à mesurer, l'échelle du micromètre de l'oculaire et l'image de l'objet sont vus simultanément. L'échelle standard du micromètre-objet est habituellement de 1 ou 2 mm.

Lors des mesures, l'objectif approprié, qui dépend de l'amplification nécessaire, est choisi et le nombre de divisions correspondant à la longueur ou à la largeur de l'image de l'objet est lu sur l'échelle de l'oculaire micrométrique. La mesure enregistrée est traduite en *longueur réelle* (qui correspond au nombre de divisions de l'oculaire micrométrique représentant le paramètre choisi à mesurer) en remplaçant l'objectif par le micromètre-objet et en déterminant le nombre de divisions de l'oculaire micrométrique correspondant à un nombre défini de division de l'échelle millimétrique du micromètre-objet, tout cela doit être réalisé *en gardant le même grossissement*.

Se rappeler que le calcul, en *longueur réelle*, de la valeur à l'échelle de l'oculaire micrométrique n'est valable qu'au grossissement de l'objectif choisi. Il sera nécessaire de recalculer la valeur sous l'oculaire pour chaque objectif de grossissement du microscope.

Parce que la morphométrie est un composant important du diagnostic parasitologique, des mesures répétées des mêmes éléments présents dans un seul prélèvement, ou d'éléments variés de dimensions différentes dans plusieurs prélèvements, nécessitant le recours à des grossissements différents, seront entreprises. En déterminant *la valeur au micromètre* à l'échelle de chaque objectif utilisé, le remplacement des objets et de la platine du microscope peut être réalisé. Le calcul rapide des dimensions en millimètres ou en fractions de mm seront possibles quel que soit l'objectif.

Le graticule est placé au niveau de l'oculaire. Il faut pour ce faire dévisser la partie inférieure de l'oculaire et le placer dans le tube ainsi ouvert. Avant de revisser, il faut s'assurer que le repère de visée est posé correctement. Il faut s'assurer également par la suite que le diamètre du repère de visée est équivalent au plus petit diamètre interne du tube. Il ne faut en aucun cas toucher la surface du repère de visée – le tenir par ses extrémités. S'assurer de l'absence de poussières et de gras. L'œil du hublot est orienté sur le repère de visée et ajuster parfaitement à l'échelle du graticule.

Le mode opératoire à suivre est le suivant :

- i) Insérer le micromètre oculaire, avec son échelle déjà établie, au microscope en s'assurant de sa compatibilité avec que l'échelle du repère de visée ;
- ii) Choisir l'objectif avec le plus faible grossissement (par exemple ×10) et orienter le microscope sur le micromètre-objet, tourner l'oculaire et le positionner sur le micromètre-objet de telle manière que les échelles des deux soient parallèles et proches voire superposées ;
- iii) Compter le nombre de divisions de l'échelle du micromètre-objet qui correspond à un nombre entier de divisions de l'échelle du micromètre oculaire ;
- iv) Diviser la valeur observée sur l'échelle du micromètre-objet par le nombre de divisions comptabilisées sur l'échelle du micromètre oculaire afin de déterminer la valeur de chaque division de l'échelle du micromètre oculaire ;
- v) Répéter le même mode opératoire ci-dessus pour chaque objectif¹⁷ ;

¹⁷ Il faut remarquer que la valeur calculée en millimètres pour chaque division du micromètre oculaire variera en fonction du grossissement de l'objectif, avec des valeurs de longueur réelle calculées qui deviendront de plus en plus petite pour une division du micromètre oculaire au fur et à mesure que le grossissement augmentera.

- vi) Conserver de manière permanente et à proximité du microscope voire attaché à lui (par exemple un morceau de carton collé sur le devant du microscope) le calcul de la valeur de chacune des divisions du micromètre oculaire pour chaque objectif.

- **Exemple**

Pour chaque objectif :

x divisions de l'oculaire = y μm (au niveau du micromètre-objet)

1 division oculaire = y/x μm

- **Examen microscopique d'un échantillon**

L'échantillon doit être examiné de façon systématique. L'observation doit commencer au plus petit objectif disponible, afin d'examiner l'échantillon dans son entier. La méthode suggérée est la suivante : commencer au coin supérieur gauche de l'échantillon, traverser la lame de gauche à droite, une largeur de champ à chaque fois, jusqu'au coin droit supérieur de la lame. Descendre d'une hauteur de champ et continuer à traverser la lame de droite à gauche, champ par champ, jusqu'au coin gauche de l'échantillon. Continuer de cette manière jusqu'à la fin de l'échantillon (coin inférieur droit). Au cours de cette observation, la mise au point doit être faite continuellement afin d'apprécier la profondeur. Quand un objet suspect est repéré, il est examiné à grand objectif, vérifié ou éliminé. Si le grossissement de l'image de l'objet est insuffisant pour visualiser les caractères morphologiques définitifs sous objectif sans huile, utiliser l'objectif à immersion ($\times 100$). Les montages peuvent être réalisés avec du vernis à ongle ou un produit pour immersion déposé.

Ni les colorations classiques ni celles avec fluorescence ne peuvent déterminer l'espèce de cryptosporidies si l'oocyste « tombe » dans l'échelle de dimensions de 4 à 6 μm (cf. tableau 1). Pour le bétail, l'opinion consensuelle est que la majorité des infections sont dues en général à *C. parvum*, aussi un diagnostic préliminaire de cryptosporidiose à *C. parvum* peut-il être fait. Néanmoins, la présence d'oocystes de dimensions 4 à 6 μm n'indique pas seulement l'espèce est *C. parvum*. De la même façon, pour les oiseaux, un diagnostic de cryptosporidiose à *C. baileyi*, *C. meleagridis* ou *C. galli* peut être réalisé en fonction du lieu d'infection et des dimensions de l'oocyste. L'identification moléculaire de l'espèce/génotype/sous-type peut être réalisée ultérieurement.

- **Résultats enregistrés de l'examen microscopique**

Les échantillons négatifs doivent être déclarés comme « aucun oocyste de cryptosporidies observé ».

Les échantillons positifs doivent être déclarés comme « oocystes de cryptosporidies observés ».

Un système quantitatif peut être utilisé en se basant sur le nombre d'oocystes observés à l'objectif $\times 40$. Néanmoins, l'examen microscopique ne peut être considéré comme une estimation quantitative puisque le nombre d'oocystes varie considérablement au cours de l'infection.

+ = moins de 5 oocystes par lame

++ = 1 à 10 oocystes par champ observé

+++ = 11 ou plus d'oocystes par champ observé

- **Ziehl-Neelsen modifié**

Solution forte de fuchsine phéniquée : Dissoudre 20 g de fuchsine dans 200 ml de méthanol absolu et mélanger sur agitateur magnétique jusqu'à dissolution. Ajouter 125 ml de phénol liquide (GPR [80 % w/w dans l'eau distillée]) avec précaution jusqu'à un mélange correct, ajuster avec de l'eau désionisée à un volume de 1 675 ml. Mélanger. Filtrer avant usage à travers un papier filtre Whatman n°1 pour éliminer les débris et garder dans une bouteille. Identifier, dater, confirmer. Conserver le flacon dans un endroit sombre à la température de la pièce.

Des fournitures commercialisées sont également disponibles. Souvent la concentration de la fuchsine de base varie d'un niveau moyen de 1 à 3 %.

Méthanol acide 1 % : ajouter avec attention 20 ml d'acide chlorhydrique (GPR/SLR) à 1 980 ml de méthanol absolu et mélanger. Transférer dans une bouteille, identifier, dater, confirmer.

Vert malachite 0,4 % : ajouter 2 g de vert malachite à 480 ml d'eau désionisée et mélanger par agitation magnétique. Filtrer au travers d'un papier filtre Whatman n°1, verser dans une bouteille, identifier, dater, confirmer.

- **Protocole**

Inclure un témoin positif à chaque fois que la procédure est réalisée.

- i) Porter des vêtements de protection et des gants jetables. Fixer à l'air le prélèvement ou le concentrer¹⁸ au méthanol pendant 3 min ;
- ii) Immerger la lame dans la solution de fuchsine phéniquée et colorer pendant 15 min ;
- iii) Rincer la lame sous un jet d'eau ;
- iv) Décolorer¹⁹ dans le méthanol acide à 1 % pendant 10 à 15 s ;
- v) Rincer sous un jet d'eau ;
- vi) Contre-colorer avec le vert malachite 0,4 % pendant 30 s ;
- vii) Rincer sous un jet d'eau ;
- viii) Sécher à l'air (le prélèvement peut être examiné avec ou sans lamelle couvre-objet. Un peu d'huile à immersion peut être versée sur la lame quand elle est examinée soit avec soit sans l'objectif à immersion, sans addition de lamelle couvre-objet. Une autre méthode est d'ajouter la lamelle et de faire le montage puis d'examiner) ;
- ix) Détecter la présence des oocystes en examinant la lame avec l'objectif ×40 au microscope optique. Confirmer leur présence avec l'objectif à immersion ;
- x) Repérer la forme et les dimensions des éléments colorés en rouge²⁰.

- **Éléments diagnostiques des oocystes de cryptosporidies colorés par la méthode mZn**

Les oocystes de *Cryptosporidium* spp. sont colorés en rouge sur un fond vert pâle. Le degré et la proportion de couleur varient avec les oocystes. En outre, les structures internes prennent le colorant de façon variable. Certains peuvent apparaître vides alors que d'autres peuvent contenir les éléments en croissant caractéristiques des sporozoïtes. Les oocystes de *C. parvum* apparaissent sous la forme de disques de 4 à 6 µm de diamètre. Les levures et les débris fécaux se colorent en rouge terne. Certaines spores de bactéries peuvent également se colorer en rouge mais elles sont trop petites pour prêter à confusion.

- **Auramine-phénol**

Auramine-phénol (AP) : Dissoudre 3 g de phénol dans 100 ml d'eau désionisée et rajouter lentement 0,3 g d'auramine O. Filtrer au travers d'un papier filtre Whatman n°1 dans une bouteille. Identifier et dater le stock de réactif. Conserver à la température de la pièce dans une bouteille protégeant de la lumière avec un bouchon étanche. Des colorations commercialisées disponibles, comme les réactifs de Lempert, sont également acceptables.

Méthanol acide à 3 % : Ajouter avec attention 60 ml d'acide chlorhydrique (GPR/SLR) à 1 940 ml de méthanol absolu et mélanger. Transférer dans une bouteille, identifier et dater.

Permanganate de potassium à 0,1 % : Ajouter 0,5 g de permanganate de potassium à 499,5 ml d'eau désionisée et mélanger avec un agitateur magnétique. Filtrer sur un papier filtre Whatman n°1 dans une bouteille, identifier et dater.

- **Protocole**

Inclure une lame témoin positif à chaque fois que la procédure est réalisée.

- i) Porter des vêtements de protection et des gants jetables. Fixer à l'air les étalements ou concentrer²¹ dans le méthanol absolu pendant 3 min ;
- ii) Immerger les lames dans l'AP pendant 10 min ;
- iii) Rincer sous un jet d'eau pour éliminer l'excès ;
- iv) Décolorer dans l'alcool acide à 3 % pendant 5 min ;

18 Des étalements d'épaisseur modérée sont recommandés.

19 Une décoloration excessive doit être évitée.

20 Les oocystes de *Isospora* spp. colorés en rouge apparaissent comme des corps ovoïdes allongés, effilés à leur extrémité et contenant soit un zygote granuleux soit 2 sporocystes. Les oocystes de *Cyclospora* spp. colorés en rouge pâle apparaissent comme des disques circulaires (8 à 10 µm de diamètre) renfermant une morula centrale. L'intensité de la coloration varie avec les oocystes. Dans les fèces, des oocystes non sporulés sont habituellement observés.

21 Des étalements d'épaisseur modérée sont recommandés.

- v) Contre-colorer avec du permanganate de potassium à 0,1 % pendant 30 s ;
- vi) Sécher à l'air à la température de la pièce²² (cf. mZn étape vii ci-dessus) ;
- vii) Détecter la présence d'oocystes en utilisant un microscope à épifluorescence équipé d'un filtre FITC en examinant la lame sous l'objectif ×20. Confirmer la présence des oocystes sous l'objectif ×40 ;
- viii) Mesure les dimensions, noter la forme des éléments fluorescents²³.

- **Éléments diagnostiques des oocystes de cryptosporides colorés avec AP**

Les oocystes de *Cryptosporidium* spp. apparaissent de forme ronde ou ovoïde et présentent une fluorescence vert pomme brillante caractéristique sur un fond sombre. Les oocystes de *C. parvum* sont ronds ou de forme en beignet, mesurant 4 à 6 µm de diamètre. Si possible, observer la préparation sous filtre UV (excitation 355 nm, émission 450 nm) parce que les sporozoïtes sont plus visibles sous UV que sous filtre FITC. Sous filtre UV, les oocystes apparaissent vert brillant et les sporozoïtes jaune vert.

- **Culture**

Il n'y a pas de méthode reproductible pour la culture de cryptosporides à partir de liquides corporels. Les systèmes de culture cellulaire *in vitro* ont été décrits pour des oocystes infectants, semi-purifiés, mais ils n'ont pas été testés suffisamment en profondeur avec des isolats renfermant des principes inhibiteurs pour être proposés en routine.

- **Méthodes immunologiques**

Trois approches pour la détection immunologique des oocystes de cryptosporides ont été démontrées comme utiles et quelques dispositifs commercialisés sont disponibles. Chacun a un niveau de sensibilité comparable et des échantillons fécaux concentrés ou non peuvent être utilisés selon le nombre d'oocystes dans l'échantillon. Les kits de diagnostic basés sur l'immuno-fluorescence et utilisant un AcM anti-*Cryptosporidium* conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine qui reconnaît les épitopes à la surface des oocystes (FITC-C-Mabs) sont plus spécifiques et peuvent être plus sensibles pour la détection des oocystes de cryptosporidies dans les étalements de fèces que les méthodes de coloration conventionnelles. En comparaison avec ceux-ci, les kits de détection basés sur les anticorps (immunofluorescence, ELISA et immuno-chromatographie) apparaissent coûteux sachant qu'ils ont un seuil de détection comparable.

- a) **Immunofluorescence directe**

En immunofluorescence directe, un AcM conjugué au FITC spécifique de genre et des épitopes de surface des oocystes de cryptosporides se lie aux oocystes présents dans l'échantillon. Une excitation UV utilisant un système de filtre FITC (longueur d'onde d'excitation de 490 nm, émission moyenne 530 nm) induit une fluorescence vert pomme brillante des oocystes. Les matériels fournis avec les kits de diagnostic commercialisés varient, mais les témoins positifs et négatifs de *C. parvum*, l'AcM conjugué FITC spécifique de *Cryptosporidium* (fourni à la dilution appropriée) et un milieu de montage au glycérol contenant un inhibiteur de la photo-décoloration sont normalement inclus dans le kit. Des témoins positifs et négatifs sont normalement réalisés à chaque analyse.

Les étalements fécaux séchés à l'air ou les enrichissements sont fixés dans le méthanol absolu (ou l'acétone selon les recommandations du fabricant) puis séchés à l'air. Souvent les lames fournies dans les kits de diagnostic sont munies de puits dans lesquels les échantillons et les réactifs sont distribués et retenus. Les instructions du fabricant doivent être suivies. C'est une fausse économie de diluer les réactifs et d'augmenter le volume testé. L'AcM anti-*Cryptosporidium* spécifique de genre est appliqué à la dilution prédéterminée sur l'échantillon séché et fixé, et les lames sont incubées horizontalement dans l'obscurité dans une chambre humide. L'excès d'anticorps est éliminé par rinçage et l'excès d'humidité essuyé. Le milieu de montage est appliqué et une lamelle couvre-objet appliquée sur l'échantillon, en s'assurant qu'aucune bulle d'air n'a été retenue. Si le milieu de montage n'est pas fourni, un mélange de 50 % de glycérol non fluorescent et 50 % de tampon phosphate PBS (v/v) est fiable. Les échantillons sont examinés à l'objectif ×20, les oocystes reconnus à l'objectif ×40 et estimés quantitativement. Les nombres sont estimés comme précédemment. En l'absence de recommandations du fabricant, la méthode suivante donne des résultats satisfaisants.

Le fluorogène nucléaire 4'6-diamidino-2-phényl indole (DAPI; [C₁₆H₁₅N₅.2HCl, FW 350.2]), peut être utilisé pour éclairer les noyaux des sporozoïtes à l'intérieur des oocystes fluorescents fournissant ainsi une

22 Ne pas sécher au papier, certains papiers renfermant des fibres fluorescentes.

23 Les oocystes suspects sont mesurés en augmentant légèrement le voltage (intensité lumineuse) de la source lumineuse de sorte que les images éclairées et fluorescentes puissent être vues simultanément. Les éléments peuvent être mesurés avec un oculaire micrométré.

information morphologique supplémentaire (13, 34). DAPI est un intermédiaire non spécifique de l'ADN, aussi l'ADN d'autres éléments cellulaires comme des bactéries et des levures seront aussi colorés. DAPI à la concentration de 0,4 µg/ml est particulièrement utile quand les oocystes sont observés dans des prélèvements non fécaux (ex. l'eau ou denrées alimentaires). DAPI réagit avec le noyau des sporozoïtes à l'intérieur des oocystes viables et non viables et induit une fluorescence bleu ciel.

Un filtre bleu (excitation 490 nm, émission 510 nm) est utilisé pour visualiser l'AcM-FITC et une excitation UV (excitation 355 nm, émission 450 nm) est utilisée pour déterminer la présence de DAPI colorant le noyau du sporozoïte.

• Protocole

Inclure une lame témoin positif à chaque fois que la procédure est réalisée. Des lames négatives et positives sont livrées dans la plupart des kits de diagnostic basés sur l'immunofluorescence et les oocystes de *C. parvum* peuvent être achetés auprès de fournisseurs²⁴.

Des oocystes autres que *C. parvum* peuvent également être obtenus auprès de laboratoires vétérinaires de diagnostic, d'instituts de recherche ou d'autres institutions. Des distributeurs locaux peuvent aussi commercialiser différents types d'oocystes.

- i) Porter des vêtements de protection et des gants jetables. Fixer à l'air les étalements ou les enrichissements dans le méthanol absolu pendant 5 min²⁵ ;
- ii) Distribuer 50 µl d'AcM anti-*Cryptosporidium* à la dilution appropriée dans chaque puits des lames. Couvrir complètement les puits²⁶ ;
- iii) Placer les lames préparées dans une chambre humide avec les lames placées au-dessus du matériel adsorbant utilisé pour générer l'humidité. S'assurer que le matériel adsorbant est bien humide ;
- iv) Placer la chambre humide dans un incubateur à 37 °C environ pendant le temps prescrit par le fabricant (normalement 30 à 60 min) ;
- v) Utiliser un matériel aspirant type Büchner pour éliminer délicatement l'excès d'AcM de chaque puits. Incliner la (les) lames préparée(s) d'un angle d'approximativement 45° par rapport à l'horizontal et vers le technicien, et aspirer le liquide qui se trouve au fond du (des) puits en plaçant l'extrémité de l'aspirateur proche du liquide mais sans le toucher. De cette manière, le liquide en trop sera aspiré. Répéter cette opération pour chaque lame contenant bien de l'échantillon ;
- vi) Distribuer 50 µl de PBS dans chaque puits et le laisser 2 min à la température de la pièce ;
- vii) Aspirer le PBS de chaque puits selon la démarche décrite dans le v). Verser au moins 50 µl de PBS dans chaque puits et le laisser pendant au moins 2 min avant d'aspirer le PBS comme décrit ci-dessus ;
- viii) Appliquer 50 µl de DAPI dilué au 1/5 000 dans du PBS dans chaque puits et le laisser au moins 2 min à la température de la pièce. La solution de DAPI prête à l'emploi est préparée en diluant 2 mg/ml de DAPI 1/5 000 dans du PBS (150 mM, pH 7,2). La solution doit être préparée extemporanément. Une solution de DAPI (2 mg/ml dans de l'éthanol) peut être conservée à 4 °C à l'obscurité indéfiniment ;
- ix) Aspirer la solution DAPI de chaque puits comme décrit dans l'étape v ;
- x) Verser 50 µl d'eau désionisée dans chaque puits et attendre 1 à 3 s à la température de la pièce, aspirer l'eau de chaque puits selon la procédure définie dans le v ;
- xi) Distribuer 50 µl de milieu de montage au centre de chaque puits de chaque lame, appliquer une lamelle couvre-objet ;

24 Par exemple, Kate Miller, Sterling Parasitology Laboratory, University of Arizona, Dept of Veterinary Science and Microbiology, Building 90, Room 308, Tucson, Arizona, 85721, USA, millerk@email.arizona.edu ou Geoff et Sue Pritchard, Bunch Grass Farm, 1301 Drury Road, Deary, Idaho, 83823, USA, pritchard@turbonet.com.

25 Éventuellement, laisser le méthanol s'évaporer, en séchant à la température de la pièce.

26 Les volumes, les temps, etc., peuvent varier selon les instructions des fabricants. Suivre toujours les instructions des fabricants.

- xii) Laisser chaque lamelle se mettre en place avant de parcourir la lame²⁷ ;
- xiii) Examiner la préparation à l'objectif $\times 20$ et confirmer sous l'objectif $\times 40$ avec un microscope à fluorescence équipé d'un filtre FITC. Mesurer les oocystes sous l'objectif $\times 100$ ²⁸. Si nécessaire, les lames sont conservées à la température de la pièce, à l'obscurité jusqu'à la lecture.

- **Éléments diagnostiques d'oocystes de cryptosporides colorés par un AcM conjugué au FITC**

Les oocystes de cryptosporidies sont ronds ou légèrement ovoïdes qui présentent une fluorescence brillante vert pomme sous filtre FITC. Leurs dimensions (longueur \times largeur mesurées) sont présentées dans le tableau 1. Souvent la fluorescence a une intensité augmentée sur la circonférence de l'oocyste, sans interruption visible de la coloration de la paroi oocystale. Si le bleu d'Evans, qui réduit la fluorescence non spécifique, est inclus dans le kit, la fluorescence de fond sera rouge. La fluorescence non spécifique est jaune. Se référer toujours au témoin positif pour s'assurer que les dimensions, la forme et la couleur de l'oocyste suspect sont compatibles avec ceux du témoin positif. Le DAPI interfère avec le noyau des sporozoïtes à l'intérieur des oocystes viables et non-viables et les rend fluorescents bleu ciel. Sous objectif à immersion $\times 100$, le noyau de sporozoïte est sphérique à subsphérique, mesurant approximativement 1 μ l de diamètre. Dans le cas où l'oocyste est déformé, la mise en évidence de 4 noyaux fluorescents dans un élément de dimensions comparables à un oocyste aidera à son identification (13, 34).

b) Détection des antigènes de cryptosporides par ELISA

Dans l'ELISA, la présence d'antigènes de cryptosporidies est recherchée dans les fèces (coproantigènes). Selon le kit de diagnostic commercialisé, les coproantigènes de cryptosporidies sont détectés et révélés par un mélange d'anticorps monoclonaux et polyclonaux. À l'exception d'une lecture automatique, les kits de détection de coproantigènes n'offrent pas une sensibilité accrue par rapport aux méthodes décrites.

Les kits commercialisés de détection d'antigènes ELISA sandwich renferment des lignes de puits de capture de coproantigènes de cryptosporides, des anticorps anti-cryptosporides conjugués à une enzyme (fréquemment la peroxydase de raifort), le substrat, le système de développement chromogène/substrat et la solution de blocage (qui inhibe les enzymes de catalyse ajoutés au mélange). Ils ont été développés pour détecter des antigènes de *C. parvum* dans des échantillons fécaux, mais ils sont capables de détecter des épitopes courants pour des infections dues à des agents autres que *C. parvum*. Les témoins positif et négatif sont inclus dans les kits. Les kits commercialisés renferment normalement tous les réactifs nécessaires à la réalisation de l'analyse et les instructions du fabricant doivent être suivies. C'est une fausse économie de diluer les réactifs pour augmenter la capacité du test. Une méthode détaillée et le calcul du seuil et de définition du négatif, du positif des échantillons sont également présentés. Les réactifs sont normalement stockés à 4 °C en dehors de leur utilisation. Tous les réactifs doivent être mis à la température de la pièce avant d'être utilisés. La personne chargée du diagnostic doit toujours vérifier s'il n'y a pas de contre-indication à utiliser un kit de diagnostic commercialisé et le fixatif utilisé pour préparer l'échantillon. Du fait des variations des méthodes décrites dans les différents kits de diagnostic commercialisés, aucune méthode ELISA ou d'immunochromatographie de détection des coproantigènes n'est décrite dans ce chapitre.

c) Détection des antigènes de *Cryptosporidium* par immunochromatographie

Si dans les systèmes ELISA, la vitesse de fixation des antigènes sur les anticorps de capture repose sur la diffusion des molécules (ce qui prend habituellement une heure), dans le cas de l'immunochromatographie à flot latéral (IC), la vitesse à laquelle les antigènes sont fixés sur les anticorps de capture liés à la phase solide est améliorée par un système de mèche. Les liquides sont attirés rapidement à travers une membrane fixée à l'intérieur de la cassette d'immunochromatographie, ce qui réduit le temps de la réaction à quelques minutes voire moins. Les antigènes solubles de *Cryptosporidium* dans l'échantillon à analyser sont attirés à travers la membrane et entrent en contact et se lient avec les anticorps anti-*Cryptosporidium* immobilisés ; cela augmente considérablement la rapidité de la réaction antigène-anticorps. Les réponses positives (seulement qualitatives) apparaissent comme des bandes colorées dans une région précise de la membrane, ce qui se traduit par une ligne sur la cassette. Dans le commerce, le système de la réaction peut

27 Ces montages temporaires peuvent être faits de façon provisoire en scellant le bord des lamelles couvre-objet avec du vernis à ongles clair. Laisser la lamelle couvre-objet se mettre en place pendant 30 min à 1 h approximativement avant de sceller. En utilisant la brosse fournie avec le vernis, appliquer avec précaution le vernis sur le périmètre de la lamelle en utilisant la largeur de la brosse. S'assurer que le périmètre de la lamelle soit scellé. Ne laisser aucune zone non scellée. Laisser sécher le vernis à la température de la pièce avant d'identifier la lame de façon appropriée avec un numéro d'identification unique. Si nécessaire, utiliser un scalpel pour éliminer tout excès séché de vernis.

28 Les oocystes suspects sont mesurés en augmentant légèrement le voltage (intensité lumineuse) de la source de lumière de telle sorte que les images fluorescentes et illuminées soient visibles simultanément. Les objets peuvent être mesurés par un oculaire micrométré.

varier beaucoup d'un kit à l'autre. Comme pour les tests ELISA pour la détection des antigènes, le technicien devra vérifier qu'aucune contre-indication n'existe quant au kit de diagnostic commercial et au fixatif utilisés.

L'IC est une méthode alternative pratique pour détecter les antigènes de *Cryptosporidium* dans les fèces. Sa spécificité semble élevée (de 98 % à 100 %). Le débat n'est pas clos quant à savoir si l'IC (de même que l'ELISA) a une sensibilité plus faible, identique ou plus élevée que les méthodes de coloration des oocystes. L'IC, comme l'ELISA, sont d'une grande valeur dans les cas d'infection où les oocystes ne sont pas détectables. Du fait des grandes variations qui existent entre les kits de diagnostic présent dans le commerce, aucune technique d'IC pour la détection des copro-antigènes n'est présentée dans ce chapitre.

• Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques

La PCR est plus sensible que les tests conventionnels et immunologiques pour détecter les oocystes fécaux bien que la sensibilité des méthodes publiées soit évaluée entre 1 et 10⁶ oocystes. Ces techniques sont souvent restreintes à des laboratoires spécialisés. Le plus grand soin doit être donné au choix des amorces puisque certains amplifient des produits spécifiques de genre (amplicons), d'autres des produits spécifiques d'espèces. Avant d'adopter une méthode de routine dans les laboratoires, les variations entre méthodes et la reconnaissance des difficultés à amplifier les acides nucléiques à partir des échantillons fécaux par PCR doivent être surmontées.

Les échantillons de fèces peuvent contenir plusieurs inhibiteurs de PCR. En plus de la bilirubine et des sels biliaires, il y a aussi des polysaccharides. Pour les cryptosporidies, le mélange des fèces dans la polyvinylpyrrolidone (PVPP) à 10 % avant extraction peut réduire l'inhibition.

L'information la plus fiable concernant l'espèce/génotype/sous type provient de l'étude de 3 locus de gènes (deux 18S ARNr [18, 24, 45, 46] et la protéine de la paroi oocystale de cryptosporidies [PPOC] [15, 38]) amplifiés par PCR-RFLP et/ou séquençage d'amplicons.

L'amplification par PCR de l'ADN de cryptosporidies en utilisant les amorces de l'ARNr 18S (CPB-DIAGF/R) de Johnston *et al.* (18) donne des produits de longueur variée entre 428 pb à 455 pb. Les amorces de Johnson *et al.* (18) sont retenues parce qu'elles ont été évaluées pour les réactions croisées avec un total de 23 micro-organismes et ces amorces se sont révélées correctes dans nombre de cas. La modification de Ward *et al.* (40) de Johnson *et al.* (18) par amorce inversée (substitution de CPB-DIAGR par PW99R [TAA-GGA-ACA-ACC-TCC-AAT-CTC], qui produit un amplicon de 420 pb approximativement) se révèle selon les auteurs plus sensible que la CPB-DIAGF/R (18) à la fois par PCR directe et PCR nichée. D'autres essais probants sont nécessaires avant de recommander la PW99R (40) en remplacement de la CPB-DIAGR. L'épreuve nichée avec l'ARNr 18S (Nichols-Johnson, 24) se révèle sensible. Une approche multi-locus est indispensable pour caractériser les isolats de *Cryptosporidium*. Une PCR multiplex spécifique d'allèles (MAS-PCR) basée sur la séquence du gène de la dihydrofolate réductase distingue *C. hominis* (357 pb) de *C. parvum* (190 pb) qui peuvent être différenciés sur gélose sans que soient nécessaires la digestion par une endonucléase et l'analyse RFLP, ce qui réduit considérablement la durée de la réaction (12). La MAP-PCR est aussi sensible que tout autre test de diagnostic qui cible le gène ARNr 18S, pour la détection de *C. hominis* et de *C. parvum* ; elle peut aussi détecter plus d'infections mixtes (*C. hominis* et *C. parvum*) que les tests basés sur le gène ARNr 18S (12). Cependant, la MAS-PCR n'a pas pu détecter dans des échantillons humains l'ADN de *C. felis*, *C. canis*, *C. muris* et les cryptosporidies du génotype porc I (17), et sa capacité à établir la gamme des espèces pathogènes trouvées chez le bétail doit être évaluée.

Habituellement, il n'y a pas de locus génique « standard » recommandé pour identifier une espèce, mais la RFLP ou le séquençage des locus ARNr 18S fournissent plus d'informations spécifiques que le locus PPOC. Pour détecter de petites quantités d'oocystes (< 100), une PCR nichée est nécessaire. Deux PCR ARNr 18S ont été testées dans le laboratoire des auteurs (24, 45, 46) et les amorces de Nichols-Johnson (24) apparaissent plus sensibles, en particulier avec de petits nombres (≤ 10) d'oocystes de *C. parvum*, *C. hominis*, *C. felis* et *C. muris* (24). Bien que moins sensible, les épreuves de Xiao *et al.* (45, 46) ont l'avantage de pouvoir détecter toutes les espèces par RFLP, notamment *C. parvum* et *C. hominis*, ce que ne peut pas faire le test de Nichols-Johnson (24).

Le Tableau 3 donne les génotypes et les espèces de cryptosporidies déterminés par RFLP des amplicons définis par les amorces CPB-DIAGR/F après digestion simultanées par les enzymes de restriction *VspI/DraI* (24), qui peuvent identifier les 5 principales espèces. Le Tableau 4 donne le résultat de la RFLP du même amplicon après digestion séparément par les enzymes *VspI* et *Asel*, *SspI* et *DdeI* selon les séquences complètes ou variables du gène ARNr 18S données par GenBank (réf. 24 et données non publiées). Le Tableau 5 donne les espèces de cryptosporidies et les génotypes déterminés par la RFLP de l'amplicon défini par les amorces XR2/XF2 et après digestion par les enzymes *Asel* et *SspI* (45).

Tous les espèces/génotypes de cryptosporides ne peuvent pas être déterminés par PCR-RFLP des locus ARNr 18S, bien que la plupart des espèces reconnues comme importantes économiquement pour le bétail puissent l'être. Le séquençage a été utilisé pour faire la distinction entre *C. parvum* et *C. bovis* ou les *Cryptosporidium* du génotype apparenté au cerf, mais ces cryptosporidies peuvent aussi être rapidement différenciées par digestion par l'enzyme *MbolI* (11). Le séquençage de l'amplicon peut fournir plus d'informations que la PPCR-RFLP, mais il est plus cher et prend plus de temps. Habituellement, les disponibilités de séquençage varient selon les régions du monde et pour la plupart des espèces courantes, la PCR-RFLP a à jouer un rôle important.

Un test de PCR-RFLP nichée en tube (15) amplifiant un fragment du gène codant la PPOC permet de distinguer *C. hominis* et *C. parvum*. Ce test est recommandé dans la référence 38 car il est plus sensible et constitue une solution pour la contamination fréquemment observée en PCR nichée à cause de la re-amplification des produits de la PCR. En PCR nichée en simple tube, les amorces internes et externes sont ajoutées au mélange réactif initial. L'optimisation des concentrations des amorces et des températures de recuit induit l'amplification préférentielle d'un seul produit défini par les amorces internes.

Aucune méthode recommandée d'extraction d'ADN oocystale de cryptosporides n'existe, et la sensibilité de la plupart des méthodes décrites n'est pas complètement arrêtée. L'ADN de cryptosporides peut être extrait soit en utilisant une concentration partielle d'oocystes selon les techniques de flottation/sédimentation précédemment décrites, soit selon l'extraction basée sur des billes de zirconium (20). Si la méthode de routine du laboratoire est la sédimentation formol-éthère, les concentrés d'oocystes disponibles pour la lyse et l'amplification par PCR peuvent être obtenus en remplaçant l'eau désionisée par du formol à 10 % selon la méthode décrite. La perte d'ADN peut être la conséquence de la purification en utilisant des colonnes commercialisées mais normalement, le nombre d'oocystes présents dans l'échantillon est suffisant pour extraire suffisamment d'ADN de cryptosporides par analyse séquentielle d'ADN par PCR-RFLP. Le choix d'une technique adaptée d'extraction de l'ADN est l'étape la plus importante pour garantir la sensibilité finale de la détection de l'ADN des oocystes.

La méthode suivante est efficace pour extraire l'ADN d'un petit nombre (environ 10+) d'oocystes partiellement purifiés et elle est utilisée dans le laboratoire des auteurs (22, 24). Les oocystes partiellement purifiés sont mis en suspension dans 100 µl de tampon (50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 1 mM d'acide éthylène diamine tétra-acétique, pH 8, 0,5 % de sulfate de sodium dodécyl [SDS], Sigma-Aldrich) et soumis à 15 cycles de congélation-décongélation (1 min en azote liquide, 1 min à 65 °C). Les échantillons sont transférés dans un bain-marie à 55 °C, la protéinase K est ajoutée (à une concentration finale de 200 µg/ml) et les échantillons sont mis en incubation pendant 3 h. La protéinase K est dénaturée par la chaleur (90 °C pendant 20 min), les échantillons sont refroidis dans la glace pendant 1 min, centrifugés (16 000 g pendant 5 min), puis 70 µl de surnageant sont retenus pour amplification PCR. SDS est un inhibiteur de la Taq polymérase aux concentrations aussi basses que 0,01 %, aussi la neutralisation du SDS est-elle nécessaire. L'addition de Tween 20 à 2 % neutralise jusqu'à 0,05 % du SDS.

Les réactifs pour les PCR sont présentés dans des tubes de 0,5 ml à paroi fine. Chaque tube renferme 90 µl de réactifs pré-mélangés (200 µM de chacun des 4 nNTPs, 200 mM de chacun des amorces CPB-DIAGR et CPB-DIAGF, la sérumalbumine bovine à 400 µg/ml de concentration finale, MgCl₂ à 3,5 mM, 2,5 U de Taq polymérase dans du tampon et Tween 20 à une concentration finale de 2 % pour inactiver 0,05 % SDS). Finalement, 10 µl de matrice ADN sont introduits sous 40 µl d'huile minérale approximativement. Les échantillons sont soumis à 39 cycles d'amplification et le résultat est visualisé sous coloration au bromure d'éthidium dans un gel d'agarose à 1,4 % (24).

Les amorces et les étapes du protocole pour amplifier les fragments de l'ARNr 18S (24, 45, 46) ou celui de la PPOC (15) sont donnés dans le tableau 6.

• Résultats enregistrés de l'examen du séquençage PCR-RFLP

Les échantillons négatifs doivent être enregistrés comme « Pas d'ADN de *Cryptosporidium* détecté ».

Les échantillons positifs doivent être enregistrés comme « ADN de *Cryptosporidium* détecté » en spécifiant l'espèce/génotype/sous type identifié (cf. Tableau 3 à 5) après identification des espèces respectivement présentées dans le tableau 2 à partir des profils RFLP.

a) PCR quantitative en temps réel

Des méthodes de PCR quantitative en temps réel utilisent des technologies brevetées (par ex. : TaqMan™, Applied Biosystems, LightCycler™, Roche Molecular Biochemicals). Dans les deux cas, des colorants fluorogènes sont incorporés à l'amplicon au cours de la PCR ; par conséquent, la fluorescence de l'amplicon augmente au fur et à mesure que du produit d'amplification est généré. Les deux systèmes peuvent détecter les produits de PCR au cours des premiers cycles de la réaction alors que l'amplification est exponentielle, ce qui permet une analyse quantitative des produits fluorescents. Les méthodes de PCR quantitative en temps réel ont été utilisées pour identifier différentes espèces de *Cryptosporidium* en exploitant le polymorphisme génétique du

gène ARNr 18S afin de créer des sondes ayant des températures de fusion différentes, et pour la détection quantitative des oocystes de cryptosporidies dans les eaux naturelles et dans les eaux usées. La sensibilité accrue de la PCR en temps réel garantit une plus grande vitesse de détection et un diagnostic qualitatif mais c'est sa capacité à quantifier les niveaux de contamination qui la rend inestimable. Le système du tube unique (*closed tube*) réduit le danger de contamination (36). À l'avenir, la PCR quantitative en temps réel devrait se révéler très utile, une fois que les problèmes liés à l'inhibition de la matrice seront réglés. À l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode validée de PCR quantitative en temps réel.

Tableau 3. Analyse structurale du gène ARNr 18S déterminée par les amorces CPB-DIAGR après digestion simultanée par les enzymes de restriction *VspI*, ou *Asel* et *DraI* (d'après la référence 24)

Espèces de <i>Cryptosporidium</i> (longueur de l'amplicon en pb)	Nombre de sites <i>VspI</i> / <i>Asel</i> (AT↓TAAT)	Nombre de sites <i>DraI</i> (TTT↓AAA)	Longueur des fragments en pb
<i>C. hominis</i> (438)	2	aucun	222 ; 112 ; 104
<i>C. parvum</i> (435)	2	aucun	219 ; 112 ; 104
<i>C. muris</i> (431 ou 432)	1	aucun	319 ; 112
<i>C. felis</i> (455)	2	1	189 ; 112 ; 104 ; 50
<i>C. baileyi</i> (428)	2	1	128 ; 112 ; 104 ; 84
<i>C. meleagridis</i> (434)	3	aucun	171 ; 112 ; 104 ; 47

Tableau 4. *Cryptosporidium* spp. et génotypes déterminés par RFLP des amplicons définis par les amorces CPB-DIAG après digestion par les enzymes *VspI* ou *Asel*, *SspI* et *DdeI*, selon les séquences du gène ARNr 18S complète/partielle disponibles sur GenBank

Espèces de <i>Cryptosporidium</i> (longueur de l'amplicon en pb)	<i>VspI</i> / <i>Asel</i>	<i>SspI</i>	<i>DdeI</i>	GenBank N° d'accèsion
<i>C. hominis</i> (438)	222, 104, 112	264, 111, 40, 12, 11	204, 166, 68	L16997
<i>C. parvum</i> (435)	219, 104, 112	264, 108, 40, 12, 11	201, 166, 68	L16996
<i>C. muris</i> (432)	320, 112	395, 37	224, 166, 42	AF093498
<i>C. andersoni</i> (431)	319, 112	394, 37	265, 166	L19069
<i>C. felis</i> (455)	239, 104, 112	401, 40, 14	221, 166, 68	AF087577
<i>C. baileyi</i> (428)	212, 104, 112	264, 164	262, 166	L19068
<i>C. meleagridis</i> (434)	171, 104, 112, 47	264, 119, 40, 11	200, 166, 68	AF112574
<i>C. serpentis</i> (430)	318, 112	380, 36, 14	264, 166	AF093502
<i>C. wrairi</i> (435)	219, 104, 112	264, 109, 40, 11, 11	201, 166, 68	AF115378
<i>Cryptosporidium</i> cochon (435)	219, 104, 112	375, 40, 11, 9	201, 166, 68	AF108861
<i>C. saurophilum</i> (432)	216, 108, 112	264, 109, 40, 19	198, 166, 68	AF112573
<i>Cryptosporidium</i> souris (439)	175, 104, 112, 48	264, 112, 40, 12, 11	205, 166, 68	AF108863
<i>Cryptosporidium</i> furet (438)	174, 103, 113, 48	264, 111, 40, 23	204, 166, 68	AF112572
<i>Cryptosporidium</i> chien (429)	213, 104, 112	264, 105, 40, 20	195, 166, 68	AF112576
<i>Cryptosporidium</i> koala (436)	220, 104, 112	264, 109, 63	202, 166, 68	AF108860
<i>Cryptosporidium</i> kangourou (436)	220, 104, 112	373, 63	202, 166, 68	AF112570
<i>Cryptosporidium</i> singe (436)	220, 104, 112	264, 109, 52, 11	202, 166, 68	AF112569

Tableau 5. *Cryptosporidium* spp. et géotypes déterminé par RFLP des amplicons définis par les amorces XR2 / XF2 après digestion par les enzymes *Asel* et *Sspl* (d'après la réf. 45)

Espèces de <i>Cryptosporidium</i>	Vspl	Sspl
<i>C. hominis</i>	561, 104, 102, 70	449, 254, 111, 12, 11
<i>C. parvum</i> gene type A	628, 104, 102	449, 254, 108, 12, 11
<i>C. parvum</i> gene type B	625, 104, 102	449, 254, 119, 9
<i>C. muris</i>	731, 102	448, 385
<i>C. andersoni</i>	731, 102	448, 385
<i>C. felis</i>	476, 182, 104, 102	426, 390, 33, 15
<i>C. baileyi</i>	620, 104, 102	572, 254
<i>C. meleagridis</i>	456, 171, 104, 102	449, 254, 108, 11, 11
<i>C. serpentis</i>	729, 102	414, 370, 33, 14
<i>C. wrairi</i>	628, 104, 102	449, 254, 109, 11, 11
<i>Cryptosporidium</i> pig	632, 104, 102	453, 365, 11, 9
<i>C. saurophilum</i>	628, 104, 102	418, 255, 109, 33, 19
<i>Cryptosporidium</i> mouse	457, 175, 104, 102	449, 254, 112, 12, 11
<i>Cryptosporidium</i> ferret	457, 174, 104, 102	449, 254, 111, 12, 11
<i>Cryptosporidium</i> kangaroo, koala	631, 104, 102	441, 254, 109, 33
<i>Cryptosporidium</i> dog	633, 102, 94	417, 254, 105, 33, 20
<i>Cryptosporidium</i> monkey	559, 104, 102, 70	461, 254, 109, 11

Tableau 6. Protocoles et étapes du cycle de la PCR pour l'ARNr 18S (références 24, 45 & 46) et la PCR nichée à un tube pour la PPOC (réf. 15)

Amorces	Protocole des étapes du cycle	Ref.
CPB-DIAGF AAG-CTC-GTA-GTT-GGA-TTT-CTG CPB-DIAGR TAA-GGT-GCT-GAA-GGA-GTA-AGG	80 °C, 5 min; 98 °C, 30 s 55 °C, 30 s ; 72 °C, 1 min ; 94 °C, 30 s 72 °C, 10 min 4 °C	1 cycle 39 cycles 1 cycle trempage
XF1 (externe) TTC-TAG-AGC-TAA-TAC-ATG-CG XR1 (externe) CCC-ATT-TCC-TTC-GAA-ACA-GGA XF2 (interne) GGA-AGG-GTT-GTA-TTT-ATT-AGA-TAA-AG XR2 (interne) AAG-GAG-TAA-GGA-ACA-ACC-TCC-A	94 °C, 3 min 94 °C, 35 s ; 55 °C, 45 s ; 72 °C, 1 min 72 °C, 7 min 4 °C	1 cycle 35 cycles 1 cycle trempage
oocry3 (externe) AGA-TTA-ACA-GAA-TGC-CCA-CCA-GGT-A oocry4 (externe) CCA-TGA-TGA-TGT-CCT-GGA-TTT-TGT-A oocry1 (interne) CCT-GGA-TAT-CTC-GAC-AAT Oocry2 (interne) GCG-AAC-TAA-TCG-ATC-TCT-CT	94 °C, 5 min 94 °C, 1 min ; 67 °C, 1 min ; 72 °C, 1 min 94 °C, 1 min ; 54 °C, 1 min ; 72 °C, 1 min 72 °C, 10 min 4 °C	1 cycle 20 cycles 35 cycles 1 cycle trempage

b) Typage et sous-typage lors de maladie et pour la recherche de la source

On ne rappellera jamais assez l'intérêt de caractériser la diversité génétique de *Cryptosporidium* à différents niveaux de spécificité, ainsi que l'importance d'une analyse appropriée des acides nucléiques. Les outils moléculaires pour la discrimination entre les espèces et au sein des espèces sont variables (4) ; la publication des séquences génomiques complètes de *C. parvum* (1) et de *C. hominis* (49) a permis le

développement d'outils adaptés pour le typage et le sous-typage (4). Les marqueurs génétiques diffèrent quant à l'information qu'ils contiennent et il convient donc de choisir avec beaucoup d'attention les fragments d'ADN qui serviront à la détection et à la caractérisation des cryptosporidies et des *Giardia* (voir Tableau 4 ci-dessus). Pour la détection des espèces, l'analyse de régions codantes bien conservées ou modérément conservées (par ex : ADN ribosomal 18S, gènes structuraux et domestiques) est suffisante tandis que pour des recherches sur la transmission de sous-types ou de génotypes ou pour l'identification des sources ou encore sur les facteurs de risque, des techniques d'empreinte (« fingerprinting ») plus discriminantes capables d'identifier un isolat ou une lignée, sont nécessaires (4, 35).

Les mêmes systèmes de typage et de sous-typage utilisés pour les prélèvements de médecine vétérinaire (et humaine) doivent être utilisés sur des échantillons de l'environnement, notamment en vue de rechercher la source de la contamination ou de suivre l'extension de la maladie. Cette précaution permettra d'éviter, lors d'investigation de santé publique sur des foyers de maladie, toute confusion pouvant survenir du fait de l'utilisation de systèmes différents sur des échantillons de nature différente (humain, hôte animal et environnement) (4, 35). La détermination des espèces doit être établie sur l'analyse d'au moins 2 locus, l'information étant plus fiable dans ce cas. L'un de ces locus doit être l'ARNr 18S ; l'autre locus devra, si possible, permettre à la fois l'identification d'espèce et ultérieurement le sous-typage. Pour le typage de *Cryptosporidium* sur la base des mini- ou micro-satellites, l'analyse et le séquençage du fragment ARN double brin, gP60, a été utilisé pour le sous-typage de *C. parvum* et de *C. hominis*, et semble permettre une discrimination des sous-espèces suffisante pour les recherches vétérinaire ou en santé publique, soit séparément soit en association (synthèse dans les références 4 et 35). Des améliorations de ces systèmes de sous-typage sont encore nécessaires, par ex. le séquençage de gP60 démontre une certaine variabilité au sein des populations de *C. parvum* mais pas de *C. hominis*. L'objectif est de trouver des éléments identifiant les isolats qui soient communs. Par ailleurs, des infections par plusieurs espèces existent tant chez les animaux que chez l'homme. Il importe donc que les systèmes d'identification et de sous-typage des espèces soient capables d'identifier ces infections mixtes afin de donner un diagnostic exact et des informations fiables. Des travaux récents ont confirmé l'intérêt des marqueurs mini- et micro-satellites dans l'étude de la structure des populations de *Cryptosporidium*, et dans la compréhension de la dynamique de transmission de l'infection (synthèse dans les références 4, 8 et 35). Les tests PCR les plus fréquemment utilisés pour la détection et l'identification de *Cryptosporidium* sont colligés dans la Tableau 7.

Tableau 7. Liste des cibles, type d'épreuve et principale utilisation des techniques basées sur l'amplification pour *Cryptosporidium* (références 4 et 35)

Cible de l'amplification	Type d'épreuve	Principale utilisation
18S rDNA	PCR, PCR nichée, séquençage, PCR-RFLP, PCR en temps réel, micro-puce	Identification d'espèces et de génotypes
Hsp70	PCR, PCR nichée, séquençage, PCR en temps réel, micro-puce	Identification d'espèces et de génotypes
PPOC	PCR, PCR nichée, séquençage, PCR-RFLP, micro-puce	Identification d'espèces et de génotypes
Actine	PCR, PCR nichée, séquençage	Identification d'espèces et de génotypes
β-tubuline	PCR, PCR nichée, séquençage, PCR-RFLP	Identification d'espèces et de génotypes
GP60	PCR, PCR nichée, séquençage	Identification du sous-génotype
Microsatellites	PCR, PCR nichée, séquençage, typage de fragment	Identification du sous-génotype
Minisatellites	PCR, PCR nichée, séquençage, typage de fragment	Identification du sous-génotype
Extra-chromosomal double stranded RNA	Transcriptase reverse, PCR, séquençage, tests de mobilité hétéroduplex	Identification du sous-génotype

Abbréviation : RFLP = polymorphisme de longueur des fragments de restriction ; Hsp70 = heat shock protein 70 ; PPOC = protéine de la paroi des oocystes de *Cryptosporidium* ; GP60 = glycoprotéine 60.

2. Épreuves sérologiques (et/ou épreuves d'immunité cellulaire si nécessaire)

La cryptosporidiose est souvent une maladie du nouveau-né et à moins qu'il n'y ait suffisamment de preuves pour exclure la présence d'oocystes infectants, les épreuves sérologiques ne présentent aucun avantage. Elles peuvent être utilisées pour des études épidémiologiques : la plupart sont basées sur des ELISA, utilisant différents extraits aqueux d'oocystes de *C. parvum* (ex. réf 14). Les épreuves d'immunité cellulaire n'apparaissent pas avoir d'avantages spécifiques et ne sont pas disponibles.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'existe pas de programme de contrôle des cryptosporidioses ni de vaccin rigoureusement testé et accepté disponible.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABRAHAMSEN M.S., TEMPLETON T.J., ENOMOTO S., ABRAHANTE J.E., ZHU G., LANCTO C.A., DENG M., LIU C., WIDMER G., TZIPORI S., BUCK G.A., XU P., BANKIER A.T., DEAR P.H., KONFORTOV B.A., SPRIGGS H.F., IYER L., ANANTHARAMAN V., ARAVIND L. & KAPUR V. (2004). Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*, **304**, 441–445.
2. ANUSZ K.Z., MASON P.H., RIGGS M.W. & PERRYMAN L.E. (1990). Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2770–2774.
3. BLAGBURN B.L., LINDSAY D.S., HOERR F.J., ATLAS A.L. & TOIVIO-KINNUNAN M. (1990). *Cryptosporidium* sp. infection in the proventriculus of an Australian diamond firetail finch (*Staganopura bella*: Passeriformes, Estrildidae). *Avian Dis.*, **34**, 1027–1030.
4. CACCIÒ S.M., THOMPSON R.C.A., MCLAUCHLIN J. & SMITH H.V. (2005). Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.*, **21**, 430–437.
5. CASEMORE D.P. (1991). Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. Broadsheet 128. *J. Clin. Pathol.*, **44**, 445–451.
6. CASEMORE D.P., ARMSTRONG M. & SANDS R.L. (1985). Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J. Clin. Pathol.*, **38**, 1337–1341.
7. CURRENT W.L. (1997). Cryptosporidiosis. In: Diseases of Poultry, Tenth Edition, Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L. R. & Saif Y.M. eds. Mosby-Wolfe, Mosby International, Lynton House, 7–12 Tavistock Square, London WC1H 9LB, UK, 883–890.
8. ENEMARK H.L., AHRENS P., JUEL C.D., PETERSEN E., PETERSEN R.F., ANDERSEN J.S., LIND P. & THAMSBORG S.M. (2002). Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates. *Parasitology*, **125**, 331–341.
9. FAYER R. (2008). General biology of *Cryptosporidium*. In: Cryptosporidiosis of Man and Animals, Fayer R. & Xiao L. eds. CRC Press and IWA Publishing, 1075 Boca Raton, FL, USA, 1–42.
10. FAYER R., SANTIN M. & XIAO L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.*, **91**, 624–629.
11. FENG Y., ORTEGA Y., HE G., DAS P., ZHANG X., FAYER R., GATEI W., CAMA V. & XIAO L. (2007). Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet. Parasitol.*, **144**, 1–9.
12. GILES M., WARHURST D.C., WEBSTER K.A., WEST D.M. & MARSHALL J.A. (2002). A multiplex allele specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) on the dihydrofolate reductase gene for the detection of *Cryptosporidium parvum* genotypes 1 and 2. *Parasitology*, **125**, 35–44.
13. GRIMASON A.M., SMITH H.V., PARKER J.F.W., BUKHARI Z., CAMPBELL A.T. & ROBERTSON L.J. (1994). Application of DAPI and immunofluorescence for enhanced identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water samples. *Water Res.*, **28**, 733–736.
14. HILL B.D., BLEWETT D.A., DAWSON A.M. & WRIGHT S.E. (1990). Analysis of the kinetics, isotype and specificity of serum and coproantibody in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*. *Res. Vet. Sci.*, **48**, 76–81.
15. HOMAN W., VAN GORKOM T., KAN Y.Y. & HEPENER J. (1999). Characterization of *Cryptosporidium parvum* in human and animal feces by single-tube nested polymerase chain reaction and restriction analysis. *Parasitol. Res.*, **85**, 707–712.

16. INTERNATIONAL AIR TRANSPORT ASSOCIATION (2003). Dangerous Goods Regulations, 44th Edition. International Air Transport Association, 800 Place Victoria, P.O. Box 113, Montreal, Quebec H4Z 1M1, Canada, 815 pp.
17. JIANG J. & XIAO L. (2003). An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50, Suppl: 542-547.
18. JOHNSON D.W., PIENIAZEK N.J., GRIFFIN D.W., MISENER L. & ROSE J.B. (1995). Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3849–3855.
19. KORICH D.G., MARSHALL M.M., SMITH H.V., O'GRADY J., BUKHARI Z., FRICKER C.R., ROSEN J.P. & CLANCY J.L. (2000). Inter-laboratory comparison of the CD-1 neonatal mouse logistic dose-response model for *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **47**, 294–298.
20. MCLAUCHLIN J., PEDRAZA-DIAZ S., AMAR-HOETZENEDER C. & NICHOLS G.L. (1999). Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3153–3158.
21. MORGAN U.M., MONIS P.T., XIAO L., LIMOR J., IRSHAD S., RAIDAL S., O'DONAGHUE P., GASSER R., MURRAY A., FAYER R., BLAGBURN B.L., LAL A.A. & THOMPSON R.C.A. (2001). Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. *Int. J. Parasitol.*, **31**, 289–296.
22. NICHOLS R.A.B., CAMPBELL B.M. & SMITH H.V. (2003). Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in UK still natural mineral waters and drinking waters using a modified nested PCR-RFLP assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 4183–4189.
23. NICHOLS R.A.B., CAMPBELL B.M. & SMITH H.V. (2006). Molecular fingerprinting of *Cryptosporidium* species oocysts isolated during water monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 5428–5435.
24. NICHOLS R.A.B. & SMITH H.V. (2004). Optimisation of DNA extraction and molecular detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in natural mineral water sources. *J. Food Protect.*, **67**, 524–532.
25. OKHUYSEN P.C., CHAPPELL C.L., CRABB J.H., STERLING C.R. & DUPONT H.L. (1999). Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J. Infect. Dis.*, **210**, 1275–1281.
26. PAVLASEK I. (1999). Kryptosporidie: biologie, diagnostika, hostitelské spektrum, specificita a vztah k životnímu prostředí (Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity and the environment). *Remedia Klin. Microbiol.*, **3** (9), 290–301 (in Czech).
27. PAVLASEK I. (2001). Nálezy kryptosporidií ve žlázatém žaludku u slepic a u volně žijících a exotických ptáků odchycených z volné přírody (Findings of cryptosporidia in the proventriculum of hens and in wild and exotic birds). *Veterinářství*, **3**, 103–108 (in Czech).
28. POWER M. & RYAN U.M. (2008).
29. ROBERT B., GINTER A., COLLARD A. & COPPE P. (1990). Diagnosis of bovine cryptosporidiosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.*, **37**, 1–8.
30. RYAN U.M., XIAO L., READ C., SULAIMAN I.M., MONIS P., LAL A.A., FAYER R., & PAVLASEK I. A (2003). Redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *J. Parasitol.*, **89**, 809-813.
31. RYAN U.M., POWER M. & Xiao L. (2008). *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Eukaryot. Microbiol.*, **55**, 22–26.
32. SMITH H.V. (1992). Intestinal protozoa. In: Medical Parasitology: a Practical Approach, Hawkey P.M. & Gillespie S.H., eds. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, 79–121.
33. SMITH H.V. (1998). Detection of parasites in the environment. *Parasitology*, **117**, S113–S141.
34. SMITH H.V., CAMPBELL B.M., PATON C.A. & NICHOLS R.A.B. (2002). Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in water concentrates using DAPI and immunofluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5198–5201.

35. SMITH H.V., CACCIÒ S.M., TAIT A., MCLAUCHLIN J. & THOMPSON R.C.A. (2006). Tools for investigating the abiotic transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitol.*, **22**, 160–166.
36. SMITH H.V. & NICHOLS, R.A.B. (2007). *Cryptosporidium*. In: Foodborne Diseases, Simjee, S.A. ed. Humana Press Inc., New Jersey 07512-1165, USA, 233-276.
37. SMITH H.V. (2008). Diagnostics. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Second Edition, Fayer R. & Xiao L. eds. CRC Press and IWA Publishing, 1075 Boca Raton, FL, USA, 173-208.
38. 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.
39. STURDEE A.P., CHALMERS R.M. & BULL S.A. (1999). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain *Vet. Parasitol.*, **80**, 273–280.
40. WARD P.I., DEPLAZES P., REGLI W., RINDER H. & MATHIS A. (2002). Detection of eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe. *Parasitology*, **124**, 359–368.
41. WEBER R., BRYAN R.T., BISHOP H.S., WALQUIST S.P., SULLIVAN J.J. & JURANEK D.D. (1991). Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current methods. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 1323–1327.
42. WEBSTER K.A., SMITH H.V., GILES M., DAWSON L. & ROBERTSON L.J. (1996). Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in faeces: comparison of conventional coproscopical methods and the polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.*, **61**, 5–13.
43. WWW.KSU.EDU/PARASITOLOGY/ Click on 'Host checklist for *C. parvum*'
44. XIAO L., ESCALANTE L., YANG C., SULAIMAN I., ESCALANTE A. A., MONTALI R.J., FAYER R & LAL A.A. (1999). Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1578–1583.
45. XIAO L., MORGAN U., LIMOR J., ESCALANTE A., ARROWOOD M., SHULAW W., THOMPSON R.C.A., FAYER R. & LAL A.A. (1999). Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3386–3391.
46. XIAO L., SING A., LIMOR J., GRACZYK, T.K., GRADUS S & LAL A.A. (2001). Molecular characterisation of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1091–1101.
47. XIAO L., FAYER R., RYAN U. & UPTON S.J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**, 72–97.
48. XIAO L., RYAN U.M. (2008). Molecular epidemiology. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Second Edition, Fayer R. & Xiao L. eds. CRC Press and IWA Publishing, 1075 Boca Raton, FL, USA, 387-410.
49. XU P., WIDMER G., WANG Y., OZAKI L.S., ALVES J.M., SERRANO M.G., PUIU D., MANQUE P., AKIYOSHI D., MACKEY A.J., PEARSON W.R., DEAR P.H., BANKIER A.T., PETERSON D.L., ABRAHAMSEN M.S., KAPUR V., TZIPORI S. & BUCK G.A. (2004). The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*, **431**, 1107–1112.

*
* *

CHAPITRE 2.9.5.

CYSTICERCOSSES*

RÉSUMÉ

*La cysticercose des animaux de rente et des animaux sauvages est causée par les stades larvaires (métacestodes) de cestodes (ténias), les stades adultes étant présents dans l'intestin de l'homme, du chien ou de canidés sauvages. La cysticercose bovine (primitivement dans le muscle) et porcine (primitivement dans le muscle, le système nerveux central et le foie) est causée respectivement par les métacestodes (cysticerques) des cestodes de l'homme *Taenia saginata* et *T. solium*. Les cysticerques de *T. solium* se développent également dans le muscle et le système nerveux central de l'homme. Les cysticerques de *T. asiatica* se développent dans le foie et les viscères du porc. Les cysticercoses et cénuroses du mouton et de la chèvre (dans le muscle, l'encéphale, le foie et la cavité péritonéale) sont causées par *T. ovis*, *T. multiceps* et *T. hydatigena* dont les adultes se développent dans l'intestin du chien et de canidés sauvages.*

*La plupart des infestations dues aux larves ou adultes de cestodes sont discrètes ou asymptomatiques. Les exceptions sont graves, la neurocysticercose humaine (NCH) potentiellement fatale causée par *T. solium* et occasionnellement la neurocénurose causée par *T. multiceps* chez l'homme. Ces parasites sont cause occasionnellement de signes oculaires ou musculaires chez l'homme. La maladie nommée « Gid » due à *T. multiceps* chez les ruminants peut nécessiter l'abattage de ces animaux. La cénurose aiguë à *T. multiceps* coenurosis et la cysticercose à *T. hydatigena* chez le mouton et la chèvre est rare mais peut être fatale. La cysticercose cause des pertes économiques par saisies des viandes et abats infestés.*

Identification de l'agent pathogène : les cestodes adultes du genre *Taenia* sont aplatis dorso-ventralement, segmentés et grands, atteignant de 20 à 50 cm (espèces du chien) à plusieurs mètres (espèces de l'homme). À l'extrémité antérieure, le scolex (tête) a 4 ventouses musculaires et peut avoir un rostre souvent armé avec deux rangées de crochets, leur longueur et leur nombre étant relativement caractéristiques d'une espèce. Un cou suit le scolex puis des segments immatures puis mûrs et enfin des segments gravides renfermant des œufs. La structure des segments, bien que peu fiable, peut aider à l'identification de l'espèce. Les espèces de *Taenia* ne peuvent pas être différenciées par la structure de leurs œufs. Les métacestodes consistent en une vésicule renfermant un ou plusieurs protoscolex invaginés. Ces « vers vésiculaires » sont à l'intérieur de la paroi du kyste à l'interface parasite-hôte. Cette structure comprend le cysticerque et le cénure.

*Les adultes de *Taenia* sont reconnaissables lors d'autopsie, par l'élimination de segments ou par les œufs. Les métacestodes sont facilement visibles lors d'autopsie et à l'inspection des viandes, mais les faibles infestations peuvent passer inaperçues. La NCH peut être diagnostiquée par les techniques d'imagerie médicale.*

Tests immunologiques : les infestations par les adultes de *Taenia* peuvent être reconnues par la détection des copro-antigènes de *Taenia* par la méthode immuno-enzymatique (ELISA), mais le test ne peut pas différencier les espèces et n'est pas disponible commercialement. L'utilisation de sondes spécifiques reste expérimentale.

Épreuves sérologiques : les épreuves pour la détection d'anticorps sériques ne sont pas utilisées couramment pour le diagnostic de la cysticercose chez l'animal excepté à des fins épidémiologiques. Le diagnostic est fait par inspection des viandes. Des antigènes ont été identifiés pouvant servir au diagnostic sérologique de la neurocysticercose chez l'homme.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : les antigènes vaccinaux ont été identifiés pour les métacestodes, mais pas pour les adultes de

T. ovis, *T. multiceps*, *T. saginata* et *T. solium*. Un vaccin contre *T. ovis* est enregistré en Nouvelle-Zélande mais n'est pas commercialisé. Un vaccin contre *T. solium* est en cours d'expérimentation pour production.

A. INTRODUCTION

Les métacestodes (ou larves de cestodes) des espèces *Taenia* spp sont la cause de cysticercoses chez plusieurs animaux de rente et sauvages, et chez l'homme. Les cestodes adultes sont trouvés dans l'intestin grêle des carnivores hôtes définitifs – homme, chien et canidés sauvages. *Taenia saginata* de l'homme provoque la cysticercose bovine, de répartition mondiale notamment en Afrique, en Amérique Latine, dans le Caucase, en Asie centrale et du sud, et dans les pays de l'est méditerranéen ; l'infestation se produit dans de nombreux pays européens. Le *Taenia solium* de l'homme provoque la cysticercose porcine et la neurocysticercose humaine (NCH). Il est observé principalement au Mexique, en Amérique centrale et du sud, en Afrique subsaharienne, et les pays non musulmans d'Asie y compris l'Inde et la Chine où sont élevés librement des porcs consommateurs de déchets. Les cysticercques de *Taenia asiatica* de l'homme dans le sud-est asiatique se développent dans le foie du porc. Le chien et les canidés sauvages sont les hôtes définitifs des métacestodes du mouton, de la chèvre et d'autres ruminants, et ceci dans de très nombreux pays bien que *T. multiceps* ait disparu des États-Unis d'Amérique (USA) et de Nouvelle-Zélande. *Taenia ovis* se développe dans le muscle du mouton, *T. multiceps* dans l'encéphale (occasionnellement dans les muscles) du mouton, de la chèvre et parfois d'autres ruminants, rarement de l'homme, et *T. hydatigena* dans la cavité péritonéale et le foie des ruminants et des porcs. Chez l'animal, le diagnostic est habituellement fondé sur l'espèce-hôte et la localisation du métacestode à l'inspection des viandes ou lors d'une autopsie. Les adultes se développent chez l'homme définitif après ingestion de métacestodes viables de la viande et des abats, qui ne sont pas suffisamment cuits ou congelés pour tuer le parasite.

Les segments gravides, éliminés par le cestode adulte, sortent spontanément de l'anus pour tomber sur le sol et libérer les œufs, ou les segments et les œufs sont entraînés directement dans les fèces. Des œufs peuvent aussi être disséminés par des moyens physiques ou par des animaux comme les mouches. Les segments de *Taenia solium* sont fréquemment éliminés par paquets. Les œufs éliminés sont immédiatement infestants. L'animal s'infeste par ingestion de segments et d'œufs ayant souillé le pâturage ou présents dans les matières fécales. Les porcs peuvent s'infester avec des œufs de *T. solium* par coprophagie de fèces de porcs qui ont absorbés des segments. L'homme peut s'infester avec *T. solium* en ingérant les œufs présents sur des légumes, etc., contaminés par des fèces ou des mains sales, par la transmission oro-fécale, par rétro-péristaltisme ou par éclosion entérale des œufs. Le diagnostic de routine est fondé sur la morphologie du cestode adulte et la présence d'œufs ou de segments dans les fèces des hôtes définitifs infestés.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Taenia saginata (le cestode du bœuf) : l'adulte est grand, 4 à 8 m de longueur et peut survivre plusieurs années, fréquemment en un exemplaire, dans l'intestin grêle de l'homme. Le scolex (ou tête) n'a ni rostre ni crochets. Les bases diagnostiques usuelles sont présentées dans le tableau 1 (16, 17, 24, 32, 34). Les segments gravides quittent habituellement l'hôte de façon isolée et migrent spontanément au travers de l'anus.

Les œufs sont typiquement des œufs de téniidés qui ne peuvent être distingués de ceux des genres *Taenia* ou *Echinococcus* spp. Les œufs de *Taenia* mesurent 30 à 45 µm de diamètre, renferment un oncosphère (ou embryon hexacanthé) portant 3 paires de crochets, présentent un embryophore épais, brun et strié transversalement ou « enveloppe » constituée de cubes ; une membrane externe et ovale, véritable paroi de l'œuf, qui est absente des œufs présent dans les fèces.

Les métacestodes (*Cysticercus bovis*) de *T. saginata* se développent habituellement dans les muscles striés du bœuf (ladrerie bovine) mais aussi chez le buffle, le renne et le cerf. Ils sont ovales, environ 0,5 à 1 × 0,5 cm de longueur, transparents et renfermant un scolex unique blanchâtre qui est morphologiquement similaire au scolex du futur cestode adulte. Ils sont entourés d'une fine capsule fibreuse produite par l'hôte. Les kystes peuvent être observés dans le foie, les poumons, les reins, le tissu adipeux et ailleurs.

Cependant, en utilisant des peptides synthétiques basés sur les séquences de protéines du parasite des rongeurs *T. crassiceps*, des niveaux raisonnables de protection ont été induits expérimentalement chez des porcelets naturellement exposés à une épreuve par *Taenia solium* (10). Le cestode du porc est plus petit que *T. saginata*, atteignant 3 à 5 m. Le scolex a un rostre portant deux rangées de crochets, le nombre et les dimensions de ces crochets pouvant aider à le distinguer des autres espèces de *Taenia* spp. (Tableau 1).

Tableau 1. Bases usuelles à l'identification des scolex et segments de *Taenia* spp.

Espèces parasites	Nombre de crochets	Longueur des crochets (µm)		Nombre de testicules	Couches de testicules	Extension de la poche du cirre aux vaisseaux longitudinaux	Nombre de ramifications utérines	
		grands	petits					
<i>T. hydatigena</i>	28–36 (26–44)	191–218 (170–235)	118–143 (110–168)	600–700	1	Oui	6–10 branches divisées	Lobes ovariens inégaux. Pas de sphincter vaginal. Testicules jusqu'aux glandes vitellogènes mais pas réunis derrière
<i>T. ovis</i>	30–34 (24–38)	170–191 (131–202)	111–127 (89–157)	350–750	1	Non	11–20 branches divisées	Lobes ovariens inégaux. Sphincter vaginal bien développé. Testicules jusqu'au bord postérieur des ovaires
<i>T. multiceps</i>	22–30 (20–34)	157–177 (120–190)	98–136 (73–160)	284–388	2	Oui	14–20 branches divisées	Lobes ovariens égaux. Couche musculaire en partie antérieure du vagin testicules jusqu'aux glandes vitellogènes mais pas réunis derrière
<i>T. saginata</i>	– Sans rostre	–	–	765–1200	1	Non	14–32 branches divisées Ratio des sous-divisions par branches : 2 à 3	Lobes ovariens inégaux avec un petit lobe. Sphincter vaginal bien développé. Testicules jusqu'aux glandes vitellogènes mais pas réunis derrière
<i>T. solium</i>	22–36	139–200	93–159	375–575	1	Oui	7–16 branches divisées	Lobes ovariens inégaux avec petit lobe accessoire pas de sphincter vaginal. Testicules réunis derrière les glandes vitellogènes
<i>T. asiatica</i>	– Avec rostre chez certains	–	–	868–904		Non	16 à 32 branches qui sont divisées Ratio entre des sous-divisions par branches : 4,4	Ovaires et sphincter vaginal bien développés. Testicules étendus comme chez <i>T. saginata</i> Protubérances postérieures sur les segments gravides

Les segments ovigères ont 7 à 16 ramifications utérines (moins de 17) et ne s'éliminent pas spontanément de leur hôte, mais passivement par paquets de segments dans les fèces.

Les métacestodes (*C. cellulosae*) se développent dans les muscles et le système nerveux central (ladrerie porcine) du porc, de l'ours et du chien, dans les tissus sous-cutanés et le système nerveux central de l'homme. Les kystes sont à peu près identiques à ceux de *T. saginata*, mais de taille un peu plus grande. Ils possèdent un scolex avec rostre et crochets identiques à ceux de l'adulte. Occasionnellement, dans l'encéphale de l'homme, ils peuvent se développer pour atteindre 2 cm ou plus et perdre leur scolex.

Tænia asiatica (ténia asiatique) : très proche mais génétiquement distinct de *T. saginata* (8), l'adulte présent chez l'homme possède un ovaire, un sphincter vaginal musculaire et une poche du cirre comme ceux de *T. saginata*, mais *T. asiatica* a un rostre, des segments avec des protubérances postérieures et 16 à 32 branches utérines avec 57 à 99 petites branches de chaque côté. Les segments s'éliminent de façon isolée et spontanément.

Les métacestodes (*C. viscerotropica*) sont petits, environ 2 mm, et possèdent un rostre et deux couronnes de crochets primitifs, ceux en position extérieure étant nombreux et petits. Ils sont observés principalement dans le parenchyme et en surface du foie des porcs domestiques et sauvages, ils peuvent être trouvés dans l'épiploon, et rarement dans les poumons et la séreuse du côlon. Occasionnellement, ils sont trouvés chez les bovins, la chèvre et les singes.

Tænia ovis : adulte dans l'intestin du chien et des canidés sauvages, atteint 1 à 2 m de longueur et possède un rostre armé (tableau 1). Les métacestodes (*C. ovis*) se développent dans les muscles (squelettiques et cardiaques) du mouton et moins souvent de la chèvre, atteignant 3,5 à 1 × 0,2 à 0,4 cm. Fréquemment, les cysticercques sont dégénérés avec un centre vert ou couleur crème, de contenu caséux ou calcifié. Un parasite similaire évolue entre chien et canidés sauvages et les muscles des rennes et des cerfs dans les pays du nord.

Tænia hydatigena : adulte de 1 à 5 m de longueur, observé dans l'intestin du chien et de canidés sauvages, et muni d'un rostre armé (tableau 1). Les métacestodes sont grands, de 1 cm jusqu'à 6 à 7 cm et le scolex a un long cou. Ils sont trouvés fixés à l'épiploon, au mésentère et occasionnellement à la surface du foie, en particulier chez le mouton, mais aussi chez les ruminants domestiques et sauvages et le porc. Un cycle loup et renne/cerf existe sous des latitudes septentrionales et pour lequel le métacestode est trouvé dans le foie de l'hôte intermédiaire, le chien pouvant aussi être un hôte définitif.

Tænia multiceps : adulte de 40 à 100 cm de longueur dans l'intestin des canidés, rostre armé (tableau 1). Les métacestodes (*Coenurus cerebralis*) forment des kystes de grandes dimensions, renfermant un liquide clair pouvant contenir plusieurs centaines de scolex invaginés sur la paroi, en grappes. Ils atteignent 5 cm dans l'encéphale du mouton, l'encéphale et le tissu musculaire de la chèvre et aussi dans l'encéphale du bétail, ruminants sauvages et occasionnellement de l'homme. Dans le tissu nerveux, les kystes ne sont pas encapsulés. Ils induisent des signes nerveux qui chez le mouton se traduisent par du « vertige », du « tournis », etc.

a) **Diagnostic des parasites adultes chez l'homme ou les canidés**

Tout parasite ou prélèvement fécal provenant d'un homme potentiellement infesté par *T. solium* doit être manipulé avec précaution et sécurité afin d'éviter toute infestation accidentelle par des œufs. *Tænia multiceps* et *Echinococcus* spp. infestent également l'homme et, puisque les œufs chez le chien ne peuvent être différenciés au niveau générique ou spécifique, en zone endémique, les mêmes précautions doivent également être prises. En plus de *Tænia* spp., l'homme et les canidés peuvent être infestés par *Diphyllobothrium* et *Hymenolepis* spp., alors que six autres genres de cestodes sont signalés occasionnellement chez l'homme. Ceux-ci sont décrits par Llyod (22) et peuvent être différenciés de *Tænia* spp. par la morphologie des proglottis et des œufs. Néanmoins récemment, *T. tæniæformis* avec des œufs morphologiquement indiscernables des œufs de teniides a été signalé chez un enfant. Chez les canidés, les œufs de *Echinococcus* spp. ne peuvent être distingués de ceux de *Tænia* spp., mais la présence du précédent peut être déterminée par les dimensions et plus récemment, un ELISA à détection d'antigène (Ag-ELISA) pour *Echinococcus* (2). Les autres vers, *Dipylidium*, *Diplopylidium*, *Mesocostoides* et *Diphyllobothrium* spp. ont des œufs et des proglottis distinguables (22, 32).

Les cestodes adultes peuvent être expulsés de l'homme par ingestion d'un anthelminthique suivi d'un purgatif et sont identifiés sur la base morphologique du scolex et des proglottis. Un outil d'auto-détection a été développé et testé au Mexique (10) ; le personnel médical dans les centres de santé reçoit des segments de ténias conservés dans un flacon et un manuel de questions à poser aux patients afin d'identifier les porteurs. Chez l'animal, une vermifugation à base d'arécoline est utilisée ; de nouveau, les cestodes obtenus sont identifiés morphologiquement. L'arécoline n'est plus disponible comme anthelminthique mais peut être obtenue auprès des compagnies fournissant des produits chimiques. En raison de ses effets indésirables, les sujets âgés, fragiles et les femelles gestantes doivent être exclus du traitement. Une dose de 4 mg/kg entraîne une expulsion en 30 min si aucune alimentation n'a été donnée au cours des heures précédentes (administration à un chien dont l'estomac est vide). La marche et le massage abdominal dans les cas récalcitrants ou des lavements pour les chiens constipés peuvent éviter le recours à une seconde dose (2 mg/kg) qui doit être prescrite uniquement avec modération. Heureusement, la vermifugation à l'arécoline est désormais remplacée par le test ELISA de détection de copro-antigène pour *Echinococcus* spp. et peut-être dans un futur proche, pour *Tænia* spp. Les ténias éliminés et récupérés après traitement anthelminthique nécessitent un traitement approprié.

Verster (34) et Loos-Frank (24) ont donné des descriptions de diagnose parasitologique de tous les *Tænia* spp. de l'homme et des animaux, leurs hôtes et leurs distribution géographique. Les clés d'identification sont données dans le document de Khalil *et al.* (16). Mayta *et al.* (25) et Loos-Frank (24)

donnent les méthodes pour monter, fixer, couper et colorer les proglottis. La technique de coloration qui suit est celle de Loos-Frank (24). Le ver, après un bain dans l'eau, peut être coloré directement, bien que les petits vers puissent être fixés dans l'éthanol en quelques minutes. Sinon les vers peuvent être fixés et conservés dans l'éthanol à 70 % renfermant 10 % d'acide lactique, le scolex et le ver étant conservés séparément. Les crochets du scolex ou du protoscolex doivent être coupés et montés dans une solution de Berlese (obtenue par dissolution de 15 g de gomme arabique dans 20 ml d'eau distillée additionnée de 10 ml de sirop de glucose et 5 ml d'acide acétique, le tout étant saturé avec de l'hydrate de chloral jusqu'à 100 g). La coloration est à base d'acide lactique et carmin : 0,3 g de carmin sont dissous par ébullition dans 42 ml d'acide lactique et 58 ml d'eau distillée, 5 ml de chlorure de fer ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) sont ajoutés après refroidissement, et peut être réutilisé pour régénérer d'anciennes solutions. Les échantillons sont trempés dans un flacon de colorant pendant plusieurs minutes pour permettre au colorant de pénétrer. Les échantillons sont alors rincés à l'eau du robinet. Ils sont ensuite fixés dans l'éthanol à 50 ou 70 % et déshydratés sous papier plastique pour aplatir les segments. L'ester méthylé de l'acide salicylique est utilisé comme éclaircissant.

Quand des segments se détachent de l'extrémité du cestode, des œufs sont libérés dans l'intestin et peuvent être trouvés dans les fèces. Des déplacements spontanés de *T. saginata* ou de *T. asiatica* à partir de l'anus sont observés par les patients (> 95 %). Quand les segments se déplacent, des œufs « collants » sont déposés en région périnéale et peuvent être détectés par application et examen d'un papier adhésif. Ces signes sont moins visibles pour les segments de *T. solium* (3). Les segments des 3 espèces peuvent être observés dans les fèces, mais sont éliminés de façon intermittente. Chez le chien, environ 50 % des segments sont expulsés spontanément par l'anus. Ces segments, quand ils tombent sur le sol, se déplacent et libèrent des œufs. Les segments restants sont éliminés dans les fèces, mais ordinairement, les segments migrent et évacuent la majorité de leurs œufs en traînée à la surface des fèces et dans les zones environnantes. Même si un segment éliminé s'est vidé de tous ses œufs, il peut être identifié comme cestode par les nombreux corpuscules calcaires concentriques de ses tissus. Les matières fécales, après homogénéisation, peuvent être traitées pour examen des œufs. Différentes techniques sont utilisées à travers le monde, y compris l'extraction et la flottation à l'acétate d'éthyl. Pour cette dernière, NaNO_3 ou une solution sucrée de Sheather (500 g de sucre, 6,6 ml de phénol, 360 ml d'eau), grâce à leur forte densité respective, sont supérieures à une solution saturée de NaCl comme solution de flottation pour les œufs de teniids. La flottation peut être réalisée dans des cellules de flottation qualitative ou quantitative, commercialisées, ou après centrifugation ce qui nécessite la technique modifiée de Wisconsin (les fèces diluées dans l'eau sont tamisées et centrifugées, le culot remis en suspension dans une solution sucrée ou de Sheather et centrifugée à 300 g pendant 4 min). Les œufs adhérant à la lamelle couvre-objet peuvent ainsi être observés. L'examen fécal est moins sensible pour *T. solium* que pour les autres espèces. La diagnose d'espèce est impossible par la morphologie des œufs, mais les sondes ADN, l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) et la PCR RFLP (polymorphisme de la longueur des fragments de restriction) sont utilisables au laboratoire. Ceci a été largement utilisé expérimentalement pour différencier des œufs fécaux de *T. solium*, *T. saginata* et *T. asiatica* (11, 12, 13). Alors que potentiellement extrapolables au chien, ces examens n'ont pas été réalisés.

Plus aucun test ELISA pour détection des copro-antigènes de *Taenia* n'est disponible commercialement pour le moment mais il peut être mis au point dans les laboratoires si les ressources sont présentes (2, 3). Des informations sur sa disponibilité pour des études épidémiologiques ou une utilisation en collaboration peuvent être obtenues auprès du Professeur P.S. Craig, OIE, Expert de référence sur l'échinococcose (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Cet ELISA à détection d'Ag a été développé expérimentalement par Allan *et al.* (2) pour détecter les copro-antigènes chez le chien, et ainsi, avec des témoins appropriés, pouvait être utilisé pour la détection d'une infestation à *Taenia* chez cette espèce. La technique néanmoins est seulement spécifique du genre. Ce test s'appuie sur des plaques à micropuits recouverts d'un anticorps monoclonal spécifique de lapin anti-*Taenia* (AST). La technique de base est décrite ci-dessous :

- i) Le surnageant fécal est recueilli, congelé ou formolé (formol à 5 % à 4 °C) à partir des échantillons fécaux. L'échantillon est vigoureusement agité à parts égales dans du tampon PBS (w/v 0,15 M) contenant 0,3 % de Tween 30. Le surnageant est recueilli par centrifugation à 2 000 g pendant 30 min ;
- ii) Un extrait hydrosoluble de segments non gravides de *Taenia* est obtenu après émulsification dans du PBS et centrifugation ;
- iii) Le sérum hyperimmun de lapin anti-extraits solubles de proglottis est fabriqué et la fraction IgG est isolée par passage et élution de l'IgG liée à la protéine A sur sépharose CL 4B (Pharmacia). Une partie de ces IgG est conjuguée à la peroxydase VI (Sigma). Le sérum est aliquoté, congelé à -20 °C. Il peut être nécessaire d'absorber les sérums sur fèces de chien dans une proportion de 2 pour 1 en les mélangeant pendant 1 h et en les récupérant par centrifugation ;
- iv) Des plaques à fond plat (Dynatech) sont remplies d'IgG de lapin anti-*Taenia* (titre protéique entre 5 et 25 µg/ml déterminé par spectrophotométrie à rayons UV) à raison de 100 µl/puits, l'antisérum dilué

dans un tampon 0,05 M NaHCO₃/Na₂CO₃ à pH 9,6. Les plaques sont incubées une nuit à 4 °C, les puits rincés 3 fois avec du PBS/0,1 % de Tween, bloqués avec du PBS/0,3 % Tween pendant 1 h et rincés de nouveau. Sont ajoutés 100 µl du surnageant fécal avec 50 % de sérum de veau fœtal, les plaques sont incubées 1 h et rincées 3 fois. 100 µl d'IgG anti-*Taenia* conjuguée à la peroxydase (dilué au 1/100 ou au 1/200) sont ajoutés, les plaques incubées 1 h avant d'être lavées 3 fois. La solution substrat (100 µl d'acide 5-amino-salicylique [Sigma] et 0,005 % d'eau dans un tampon phosphate à 0,1 M renfermant 1 mM de Na₂EDTA [éthylène diamine tétra-acétique acide] à pH 6) est ajoutée pendant 25 min et le résultat est lu à 450 nm. La valeur seuil est la moyenne plus 3 écart-types des valeurs de fèces de chien sain.

b) Diagnostic des métacestodes

Chez l'animal vivant, les métacestodes de *T. solium* ou de *T. saginata* peuvent être palpés dans la langue, à la fois chez l'animal vivant et en examen *post mortem* ou en inspection des viandes, la palpation de la langue a une valeur diagnostique uniquement chez le porc et le bétail fortement infesté ; en outre, ils peuvent être difficiles à distinguer de grands kystes à *Sarcocystis*.

• Inspection des viandes – procédure diagnostique principale

Les métacestodes sont visibles d'abord comme de très petits kystes, environ 1 mm, et leur détection requiert de fines coupes de tissus au laboratoire. La plupart des jeunes kystes sont entourés par une couche ou capsule de cellules inflammatoires (histologiquement, les cellules mononucléées et les éosinophiles prédominent). Plus tard, les kystes peuvent dégénérer mais les capacités du parasite à échapper au système immunitaire font que, au cours de l'infection, quand les kystes mûrissent, peu de cellules inflammatoires sont présentes à proximité du kyste et le cysticerque en localisation intermusculaire est entouré d'une fine capsule fibreuse.

Théoriquement, les kystes peuvent être visualisés ou perçus au toucher dans des tissus comme la langue chez des animaux fortement infestés, dès la 2^e semaine après l'infestation. Les kystes sont vraiment visibles à partir de 6 semaines, et quand ils sont mûrs, sont habituellement ovales, environ 10 × 5 mm, avec une membrane blanche, fine, totalement transparente et une capsule provenant de l'hôte ; un liquide clair interne est observable ainsi que le scolex, qui est visible comme une tache blanche à l'intérieur du kyste et qui est habituellement invaginé au milieu du grand axe du kyste.

À l'inspection de la carcasse, la plupart des kystes détectés, souvent 85 %, à 100 % sont morts. La proportion selon laquelle les kystes vieillissent, meurent et ainsi dégénèrent, varie selon l'espèce parasite et aussi selon le tissu dans lequel le kyste est enchâssé. Habituellement, la mort du kyste survient dans les 9 mois qui suivent l'infection d'une vache adulte par *T. saginata*. Néanmoins, les kystes peuvent rester viables pendant plusieurs années. Les kystes de *T. hydatigena* dans la cavité péritonéale du mouton et ceux de *T. solium* survivent des années dans l'encéphale de l'homme, et les symptômes ne s'expriment souvent que lorsque les kystes dégénèrent. En général, les kystes meurent plus vite dans leurs sites d'élection musculaire comme le cœur. La plus grande répartition des parasites dans ces organes tient peut-être à la plus grande vascularisation de ces muscles. À l'inverse, l'activité musculaire plus importante peut endommager le parasite, autorisant la libération du liquide et peut-être l'incapacité du parasite à échapper à la réponse immunitaire. Des kystes à des stades différents de viabilité et de dégénérescence peuvent être retrouvés chez le même hôte.

Les kystes en dégénérescence varient dans leur aspect. La capsule fibreuse de l'hôte s'épaissit et devient opaque, mais le kyste à l'intérieur reste apparemment normal. Le liquide devient progressivement trouble et envahi de cellules inflammatoires. La cavité du kyste se remplit de matériel verdâtre (éosinophile), puis jaune, caséeux, d'aspect repoussant, souvent de dimensions plus grandes et probablement plus facile à voir dans la viande que le kyste originel viable. Plus tard, le kyste se calcifie. Parce que la méthode PCR a été largement utilisée pour différencier les teniides adultes chez l'homme, elle pourrait être appliquée pour l'identification confirmée de métacestode. Toutefois, dans une étude récente, la PCR n'a identifié que 50 % des kystes dégénérés attribué à *T. saginata* (1). Quand des kystes très jeunes (sans scolex) ou dégénérés doivent être différenciés d'autres lésions, la compression du kyste, le calque du contenu caséeux et l'examen histologique de lames colorées à l'hématoxyline et l'éosine sont utilisés. L'examen microscopique peut révéler des corpuscules calcaires (concrétions concentriques de minéraux d'environ 5 à 10 µm). Ceci indique une origine due à un cestode et permet de différencier un kyste parasitaire immature ou dégénéré d'un simple kyste. La présence de crochets et leur longueur associés à l'identification de l'espèce parasitée et du tissu concerné peut aider à l'identification. La coloration immunohistochimique a permis la différenciation entre des kystes de *T. saginata* et d'autres structures n'appartenant pas à des ténias (27). La PCR peut être très utile pour trouver un nouveau cestode chez une espèce animale ou une zone géographique chez qui, historiquement, le parasite était absent (1), mais elle n'est encore qu'expérimentale.

Après le traitement de *T. saginata* et de *T. solium* chez le bétail et le porc avec des médicaments comme l'albendazole et l'oxfendazole, les kystes peuvent perdre leur liquide et dégénérer. La lésion qui en résulte

est plus petite que celle observée après une mort naturelle. Néanmoins, les kystes morts avant le traitement de l'animal resteront grands et visibles. Le traitement des porcs avec l'oxfendazole (30 mg/kg) 3 mois avant l'abattage a été proposé comme mesure de contrôle.

Les procédures d'inspection des viandes varient avec le parasite et l'hôte impliqué, c'est à dire zoonotique ou non, le tissu concerné et les réglementations du pays considéré. Les examens tendent à être plus sévères avec les infestations zoonotiques à *T. saginata* et *T. solium*.

En général, les procédures d'inspection consistent à :

- i) Inspection visuelle de la carcasse, des surfaces de section, et des organes. Ceci peut révéler *T. saginata*, *T. solium* et *T. ovis* dans les muscles, *T. hydatigena* dans le foie, le mésentère et l'épiploon ou *T. mutliceps* dans l'encéphale ;
- ii) Les masseters internes et externes et les ptérygoïdiens doivent être examinés un à un et être incisés 1 ou 2 fois, les coupes devant être parallèles à l'os et perpendiculaire au muscle ;
- iii) La partie libre de la langue est examinée visuellement et par palpation, notamment pour *T. solium* ;
- iv) Le péricarde et le cœur sont examinés visuellement. Habituellement, le cœur est incisé une fois dans sa longueur au niveau du ventricule gauche et du septum interventriculaire, exposant ainsi les surfaces internes et de coupe à l'examen. Les incisions vont de la base à l'apex et des réglementations peuvent requérir parfois des incisions supplémentaires (parfois 4) profondes dans le ventricule gauche. Sinon le cœur peut être examiné en surface puis en interne après des coupes au travers du septum interventriculaire et une éversion ;
- v) Les muscles du diaphragme, après résection du péritoine, sont examinés et peuvent être incisés ;
- vi) L'œsophage est examiné ;
- vii) En particulier dans les pays africains, le muscle triceps du bras est incisé profondément 5 cm en dessous du coude. Des coupes supplémentaires peuvent être faites. Le muscle droit interne peut être également incisé parallèlement à la symphyse pubienne. Ces incisions peuvent aussi être réalisées pour *T. solium* du porc. De telles incisions concernant les membres sont faites en Afrique parce que de nombreux parasites sont soupçonnés de se loger dans ces muscles chez l'animal de travail ou de pâturage parcourant de longues distances en relation avec un exercice et, par conséquent, un flux sanguin augmenté pour ces masses musculaires. D'autres pays requièrent de telles incisions dans les muscles des membres. Néanmoins, comme cela dévalue la viande, ces incisions doivent être faites généralement une fois qu'un ou plusieurs kystes a été trouvés en un site électif signant ainsi l'étendue de l'infestation.

L'incision initiale dans tout tissu est la plus importante, mais des incisions supplémentaires peuvent être requises par des réglementations ou requises si des kystes sont observés à la faveur de(s) incision(s) initiale(s). Les détails de l'inspection des viandes sont disponibles dans les documents de Herenda (15) et de Kyvsgaard & Murrell (17).

Des procédures supplémentaires peuvent être requises pour des parasites spécifiques et l'évaluation des carcasses, des viscères, des abats et du sang varieront selon les espèces de *Taenia* et les réglementations des pays. La décision concernant les carcasses infestées sera prise selon 3 modalités : i) autorisation pour la consommation humaine ; ii) saisie partielle et autorisation pour le reste de la carcasse, mais dans le cas des zoonoses à *T. saginata* et *T. solium*, la carcasse, la viande et les viscères doivent être traités, iii) saisie totale des carcasses fortement infestées ou cachectiques en raison d'autres maladies.

T. saginata : le bétail de moins de 6 semaines ou de moins de 32 kg n'est, en général, pas examiné. Les sites électifs sont le cœur, la langue, les masseters et le diaphragme, probablement parce qu'ils reçoivent une vascularisation importante. Néanmoins, les kystes peuvent être trouvés dans tout muscle de la carcasse. Si la carcasse d'un lot est trouvée infestée, toutes les carcasses du même lot doivent être conservées jusqu'à l'obtention d'une confirmation du laboratoire. Si l'infestation à *T. saginata* est confirmée, des incisions complémentaires sont habituellement faites sur les carcasses du lot ; toutes les lésions suspectes trouvées sur les autres carcasses sont considérées comme étant dues à *T. saginata* sans confirmation du laboratoire. Les lésions dues à *T. saginata* doivent être distinguées des kystes à *Sarcocystis* ou d'autres lésions. Au cours d'études récentes en Allemagne, en Suisse et en Nouvelle-Zélande, près de 20 % de kystes viables attribués à *T. saginata* n'ont pu être identifiés par PCR ; ce qui laisse à penser que des bovins peuvent être infectés par des cestodes non identifiés (1). À l'inverse, des oncosphères erratiques de *T. saginata* peuvent entraîner des lésions cérébrales et doivent donc être prises en compte lors de diagnostic de troubles nerveux (9).

Décision : si une carcasse est considérée comme fortement infestée, alors la carcasse, la viande, les abats et le sang sont saisis. La description d'une forte infestation varie, mais généralement elle repose sur la détection de kystes en deux sites électifs ou plus de deux sites dans les membres. Dans le cas d'une infestation moindre, les parties infestées et les tissus environnants sont éliminés et détruits. Même si à l'inspection seul un kyste mort est observé, le traitement de la carcasse et des viscères consommables est justifié parce qu'environ 10 % des carcasses faiblement infestées sont trouvées porteuses à la dissection de kystes morts et viables. Le traitement varie avec le pays et les équipements disponibles et comprend : i) congélation à au moins -10°C pendant 10 à 14 jours, ou au moins -7°C pendant 21 jours ; ii) la viande désossée est congelée à au moins -10°C pour au moins 20 jours ; iii) cuite à au moins 60°C à cœur ; iv) soumise à une pression de $0,49\text{ kg/cm}^2$; v) cuite entre 95 et 100°C pendant 30 min ; ou vi) marinée dans le sel pendant 21 jours entre 8 et 12°C . La congélation brutale nécessite une attention particulière ; généralement, un morceau de 30 kg requiert 2 cycles de 24 h à $-30,9^{\circ}\text{C}$ suivis d'une conservation à $-23,3^{\circ}\text{C}$ pendant 72 h pour tuer les scolex. Fréquemment la viande non traitée peut être exportée bien que dans certains pays, elle ne puisse être exportée que si elle a été salée au préalable.

T. solium : les sites électifs sont ceux de *T. saginata* bien qu'une forte prévalence soit signalée dans les épaules et les cuisses. Habituellement une incision (ou plus) est requise à 2,5 cm au-dessus du coude. Il est affirmé que l'on détecte ainsi 13 % des carcasses infestées qui autrement ne seraient pas repérées.

Décision : dans certains pays, tout porc fortement ou faiblement infesté ainsi que le sang et les viscères sont saisis. Dans les zones où l'infestation est habituelle, les carcasses faiblement infestées peuvent être cuites, marinées et occasionnellement congelées.

Taenia hydatigena : le parasite migrant dans le foie laisse des trajets hémorragiques qui deviennent ensuite verts/bruns avec l'inflammation puis blancs à cause de la fibrose. Pour l'enregistrement, ils doivent être différenciés de ceux de la grande douve, si possible, par l'identification des cysticerques ou des douves adultes. Les taches de lait dues à l'infestation par *Ascaris* sont discernables car les lésions apparaissent de couleur pâle à blanche, petites, sous forme de foyers isolés. Quelques kystes restent prisonniers sous la capsule du foie. Ils sont habituellement petits et dégénèrent précocement puis se calcifient pour donner des lésions en forme de chou-fleur. Les kystes de *Taenia hydatigena* mûrissent habituellement dans la graisse du mésentère. Ceux qui restent à la surface du foie sont en général superficiels et sous-séreux alors que les kystes hydatiques à *Echinococcus granulosus* sont plus profonds dans le parenchyme. Quand ils sont viables, le premier a un scolex unique allongé dans un kyste contenant un liquide translucide. Les kystes hydatiques sont plus épais avec une membrane externe qui enveloppe des capsules renfermant de nombreux protoscolex. Ceux-ci ressemblent à un dépôt sableux dans le kyste. La différenciation peut se révéler importante lors de la mise en œuvre de mesures de contrôle de l'échinococcose et le recours à l'histologie peut être nécessaire. La coloration à l'hématoxyline-éosine révélera la membrane germinative même sur de très jeunes kystes hydatiques comme le signalent Llyod *et al.* (23). Sa présence ou son absence peut être confirmée par la coloration à l'acide per-iodique de Schiff, les protéines fortement glycolysées de la membrane germinative étant colorées en rouge. Les lésions dues à *T. hydatigena* chez le bétail et le porc peuvent ressembler à celles de la tuberculose. Néanmoins, les nœuds lymphatiques satellites ne sont pas impliqués, le contenu des kystes parasitaires sont plus facilement expulsés et des restes de crochets et de corpuscules calcaires peuvent être observés ou, en cas de tuberculose, la coloration de Ziehl-Neelsen peut révéler des bactéries.

Décision : habituellement seuls quelques kystes ou des trajets sont présents et peuvent être bien nets. Les foies et l'épiploon fortement infestés sont saisis. Des infestations aiguës sont rarement observées, avec de grands nombres de parasites en migration produisant une hépatite traumatique, de l'ascite, des œdèmes, etc., entraînant secondairement une saisie de la carcasse.

Taenia multiceps : le site de prédilection est l'encéphale et la moelle épinière.

Au début, la migration des parasites peut entraîner des trajets hémorragiques rougeâtres puis gris, purulents dans l'encéphale et, lors de forte infestation, le mouton peut présenter une méningo-encéphalite. Les signes cliniques du kyste mûr causant une atrophie par pression des tissus nerveux environnants varient selon sa localisation dans l'encéphale. Si les kystes sont localisés dans les hémisphères cérébraux, la vision et la locomotion peuvent être atteintes et le mouton peut progressivement être incapable de s'alimenter et devenir cachectique. Les kystes situés dans le cervelet peuvent entraîner des signes d'ataxie ou d'opisthotonos plus graves et plus aigus. Lors d'une forte infestation, les parasites migrent et se développent dans d'autres tissus, mais meurent précocement. Ils produisent de petites lésions de 1 mm, qui renferment un kyste encapsulé, puis éosinophilique, du matériel caséux qui peut ensuite se calcifier.

Décision : Au départ, seule la tête est saisie et quelques kystes peuvent être retirés s'ils sont nettement visibles dans le tissu intermusculaire ou sous-cutané. Lors d'une infestation chronique, l'animal peut être incapable de s'alimenter et sera saisi alors pour cachexie, etc.

Tænia ovis : les sites de prédilection sont ceux de *T. saginata*. Les kystes peuvent être confondus avec les grands kystes de *Sarcocystis gigantea*.

Décision : habituellement, la détection jusqu'à 2 à 5 kystes entraîne une saisie partielle et le reste est accepté. Cela ne préjuge pas de la présence inesthétique de parasites vivants ou dégénérés dans d'autres tissus. Les ultrasons et les rayons X ont été testés pour leur détection. Certaines autorités peuvent exiger que la viande soit désossée, nettoyée congelée ou cuite. Lors de fortes infestations, la carcasse est saisie.

Les procédures d'inspection des viandes permettent la détection d'environ 20 % à 50 % des animaux réellement infestés. Les infestations modérées passent aisément à côté de la palpation et de l'inspection de la viande – dans une étude, 78 % des carcasses infestées avec plus de 20 kystes sont détectées (comparées aux carcasses détectées par dissection), alors que seulement 31 % de celles avec peu de kystes le sont (35). L'efficacité de l'inspection des viandes varie avec le nombre et la localisation des incisions, et l'expérience des inspecteurs. Par exemple, au Zimbabwe, 58 % du bétail ne présente des lésions qu'au niveau de la tête, 20 % seulement au niveau des épaules, 8 % seulement dans le cœur, alors que 81 % sont considérés comme infestés si on inclut les 3 organes. Walther & Koste (35) au Kenya trouvent également que les sites de prédilection ne sont pas nécessairement infestés dans 57 % des carcasses considérées comme positives à la dissection. Ils confirment l'importance des incisions des épaules dans la détection en Afrique puisque 20 % du bétail est confirmé comme infesté uniquement par inspection des épaules. Toujours au Kenya, Wanzala *et al.* (36) ont décrit l'efficacité de l'inspection des viandes dans la détection des cysticerques : seulement 50 % des bovins infestés naturellement ou expérimentalement ont été identifiés. Leurs observations indiquent que de nombreux cysticerques viables peuvent être ignorés.

Chez l'homme, le signe le plus habituel de l'infestation cérébrale par *T. solium* est la crise d'épilepsie suivie par des céphalées, mais un plusieurs signes comme des vomissements, des psychoses, etc., sont observés selon le nombre, la localisation, la viabilité ou le niveau de dégénérescence des cysticerques (viable, en dégénérescence, calcification) (4, 21, 26). Chez l'homme, l'évaluation clinique et soit la tomodensitométrie (le mieux pour les kystes calcifiés), soit l'imagerie par résonance magnétique (détection de kystes à la fois en localisation parenchymateuse ou non, et suivi de l'évolution de la lésion) sont utilisés pour la détection des localisations exactes et la viabilité des métacestodes de *T. solium* et *T. multiceps*. Ceci reste le moyen le plus efficace pour le diagnostic, mais l'accès aux équipements d'imagerie peut ne pas être disponible en zones d'endémie. Les kystes calcifiés dans les tissus sont détectés par radiographie. Un diagnostic sérologique est maintenant disponible pour la neurocysticercose humaine

2. Épreuves sérologiques

Le développement d'une épreuve de diagnostic sensible, spécifique et automatisable réduirait grandement le coût de dépréciation de la carcasse et aussi le coût des manipulations. Les épreuves sérologiques pour animal n'ont pas atteint le stade où la commercialisation pour un diagnostic individuel ou à grande échelle de carcasses infestées à l'abattoir serait possible. Toutes les méthodes testées – Ag-ELISA, Anticorps-ELISA, et EITB (*Enzyme-linked Immuno-electro Transfer Blot*) et inspection de la langue – montrent une faible sensibilité chez le porc fermier infesté naturellement et faiblement par *T. solium* (7, 29). Ceci est en contradiction avec la forte sensibilité et spécificité du test appliqué commercialement aux porcs élevés à l'abri de l'infestation et aux porcs expérimentalement infestés par *T. solium* (29, 30). Ce fait est également vérifié pour les infestations du bétail avec *T. saginata* (28, 33). Ainsi, seul un faible pourcentage (13 à 22 %) du bétail hébergeant moins de 30 à 50 cysticerques viables est détecté par Ag-ELISA. À l'inverse, les anticorps se révèlent plus utiles pour la détection des kystes qui ne sont plus viables. Néanmoins, les Ag-ELISA sont utiles dans des études épidémiologiques de terrain pour révéler la transmission. Par exemple, la détection d'infestation viable chez le bétail ou le porc indiquerait la source de l'infestation, la saison de la transmission et l'âge des animaux à risques. La mise au point de tests plus sensibles et plus spécifiques avec des antigènes recombinants pour le diagnostic de la neurocysticercose devrait améliorer le diagnostic immunologique de *T. solium* chez les porcs.

Plusieurs tests EITB et ELISA pour la recherche d'anticorps contre *T. solium* chez l'homme sont maintenant disponibles dans le commerce (par exemple, Immunetics, USA; Cypress Diagnostics, USA; Diagnostic Automation, USA; United Biotech, USA, Arup Laboratories, USA; Biopharm, Allemagne). Un Ag-ELISA utilisant des anticorps polyclonaux ou monoclonaux (pour la détection d'Ag dans le liquide céphalo-rachidien) a une spécificité et une sensibilité pouvant atteindre 86 % chez des patients sélectionnés. La spécificité de ces tests tend à être très haute, mais la sensibilité très basse, ceci est en partie en relation avec le nombre de kystes. La hiérarchie des symptômes, des études d'imagerie et des méthodes sérologiques a été présentée par del Brutto *et al.* (6).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

L'identification immunochimique des Ag vaccinaux et leur production par la technologie utilisant l'ADN recombinant ont été exceptionnellement concluantes pour les teniidés par comparaison avec d'autres eucaryotes et sont décrits par Lightowlers & Gauci (18, 19, 20). La vaccination avec les produits cités a été très efficace. Toutes ces réussites ont pu être réalisées grâce au fait qu'une forte immunité protectrice apparaît après une infestation naturelle, que de hauts niveaux d'immunité sont obtenus par les Ag d'extraits d'oncosphères, qu'il y a une bonne immunité croisée entre les espèces de *Taenia*, et que l'immunité est de nature essentiellement humorale comme le prouve le transfert passif d'immunité de la mère de sorte que les Ac pourraient être utilisés comme sonde de détection des Ag protecteurs. Le premier vaccin développé a été le vaccin contre *T. ovis*. L'Ag 45W de *T. solium* a été isolé comme protéine recombinante à partir de *E. coli*. Le contrôle de l'efficacité se fait par Ag-ELISA et l'immunogénicité *in vivo*, et le vaccin a donné une protection d'au moins 1 an dans des essais de terrain. Deux autres antigènes (To16K et To18K) ont été isolés et clonés et chacune de ces protéines est immunogène. En utilisant les bénéfices d'une immunité croisée et en travaillant avec l'ADNc de *T. ovis*, des homologues des antigènes de *T. ovis*, TSA9 et TSA18, équivalents à To45W et To18, ont été identifiés dans l'ADN de *T. saginata* puis clonés à partir de l'ARNm de l'oncosphère de *T. saginata*. À l'inverse des Ag individuels de *T. ovis*, l'immunisation avec les deux Ag de *T. saginata* se révèle nécessaire pour produire un haut niveau de protection. Les homologues des antigènes de *T. ovis* ont aussi été clonés à partir de l'ARNm de *T. solium* et des antigènes TSO45 et TSOL18 de *T. solium*. Les deux vaccins *T. ovis* et *T. saginata* donnent respectivement plus de 94 % et 98 % de protection chez le mouton et les bovins. Des antigènes comparables ont été maintenant identifiés chez *T. multiceps*. Le vaccin contre *T. ovis* a été enregistré en 1994 par l'Animal Remedies Board de Nouvelle-Zélande. Néanmoins, en raison des changements du marché néo-zélandais, le vaccin n'est plus disponible commercialement. Le coût d'une production à grande échelle des antigènes, les conditions de production et les variations potentielles dans les antigènes exprimés ont été exposés brièvement par Lightowlers & Gauci (20). Les antigènes de *T. solium*, notamment TSOL18 ont donné expérimentalement de très bons niveaux de protection (99 %) (18) ; cet antigène suit les mêmes étapes que les antigènes de *T. ovis* en vue de développer un vaccin d'usage pratique. D'autres pistes pour la production d'antigènes vaccinaux sont explorées. Des peptides synthétiques à partir des séquences des antigènes recombinants de teniidés induisent l'apparition d'anticorps mais pas de protection, indiquant ainsi que les épitopes protecteurs reposent sur une conformation moléculaire. Des niveaux raisonnables de protection ont été obtenus expérimentalement chez des porcelets exposés à une épreuve naturelle de *T. solium*, en utilisant des peptides synthétiques issus de la séquence protéique du parasite murin *T. crassiceps* (14). Le vaccin sous-unitaire S3PVac contre *T. solium* s'est révélé efficace sur le terrain en protégeant contre l'infestation naturelle, mais des recherches complémentaires sont nécessaires (5, 31). Il est possible que les analyses coût-bénéfices concernant l'utilisation du vaccin contre *T. saginata* devancent son utilisation dans de nombreux pays puisque le coût du vaccin est très élevé dans l'économie du bétail. L'importance de *T. solium* chez l'homme augmente le coût de la maladie, mais il reste à déterminer si l'importance de la maladie en zone d'endémie sera suffisante pour favoriser la production commerciale du vaccin et son utilisation chez les porcs. Des méthodes sensibles de diagnostic immunologique des métacestodes sont encore à développer pour permettre l'évaluation des vaccins.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABUSEIR S., EPE C., SCHNIEDER T., KLEIN G. & KÜHNE M. (2006). Visual diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis during meat inspection: is it unequivocal? *Parasitol. Res.*, 99: 405-409.
2. ALLAN J.C., CRAIG P.S., GARCIA NOVAL J., MENCOS F., LIU D., WANG Y., WEN H., ZHOU P., STRINGER R., ROGAN M. & ZEYHLE E. (1992). Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans. *Parasitology*, 104, 347-355.
3. ALLAN J.C., VELASQUEZ-TOHOM M., TORRES-ALVAREZ R., YURRITA P. & GARCIA-NOVAL J. (1996). Field trial of the coproantigen-based diagnosis of *Taenia solium* taeniasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 54, 352-356.
4. CARPIO A., PLACENCIA M., SANTILLAN F. & ESCOBAR A. (1994). A proposal for classification of neurocysticercosis. *Can. J. Neurol. Sci.*, 21, 43-47.
5. DE ALUJA A.S., VILLALOBOS N.M., NAVA G., TOLEDO A., MARTINEZ J.J., PLANCARTE A., RODARTE L.F., FRAGOSO G. & SCIUTTO E. (2005). Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine*, 23, 4062-4069.

6. DEL BRUTTO O.H., RAJSHEKHAR V., WHITE A.C. JR, TSANG V.C., NASH T.E., TAKAYANAGUI O.M., SCHANTZ P.M., EVANS C.A., FLISSER A., CORREA D., BOTERO D., ALLAN J.C., SARTI E., GONZALEZ A.E., GILMAN R.H. & GARCIA H.H. (2001). Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology*, **57**, 177–183.
7. DORNY P., BRANDT J. & GEERTS S. (2005). Detection and diagnosis. In: WHO/FAO/OIE Guidelines for the Surveillance, Prevention and Control of Taeniosis/Cysticercosis, Murrell K.D. ed. OIE, Paris, 45–55.
8. EOM K.S. (2006). What is Asian *Taenia*? *Parasite Int.*, **55**, S137–S141.
9. FATZER R., VANDEVELDE M. & GOTTSTEIN B. (2002). Cerebral *Taeniid* oncospherical lesions in two BSE suspects. *Vet. Rec.*, **150**, 46–47.
10. FLISSER A., VAZQUEZ-MENDOZA A., MARTINEZ-OCANA J., GOMEZ-COLIN E., LEYVA R.S. & MEDINA-SANTILLAN R. (2005) Short report: evaluation of a self-detection tool for tapeworm carriers for use in public health. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **72**, 510–512.
11. GASSER R. & CHILTON N.B. (1995). Characterisation of taeniid cestode species by PCR-RFLP of ITS2 ribosomal DNA. *Acta Trop.*, **59**, 31–40.
12. GONZALEZ L.M., MONTERO E., MORAKOTE N., PUENTE S., DIAZ DE TUESTA J.L., SERRA T. LOPEZ-VELEZ R., MCMANUS D.P., HARRISON L.J., PARKHOUSE R.M. & GARATE T. (2004). Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia saginata asiatica* taeniasis through PCR. *Diagn. Microbial. Infect. Dis.*, **49**, 183–188.
13. HARRISON L.J., DELGADO J. & PARKHOUSE R.M. (1990). Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* with DNA probes. *Parasitology*, **100**, 459–461.
14. HUERTA M., DE ALUJA A.S., FRAGOSO G., TOLEDO A., VILLALOBOS N., HERNANDEZ M., GEVORKIAN G., ACERO G., DIAZ A., ALVAREZ I., AVILA R., BELTRAN C., GARCIA G., MARTINEZ J.J., LARRALDE C. & SCIUTTO E. (2001). Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine*, **20**, 262–266.
15. HERENDA D., CHAMBERS P.G., ETTRIQI A., SENEVIRATNA P. & DA SILVA T.J.P. (2000). Manual on meat inspection for developing countries. *FAO Animal Health and Production paper 119*.
<http://www.fao.org/docrep/003/t0756e/T0756E00.htm>
16. KHALIL L.F., JONES A. & BRAY R.A. (1994). Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates. Wallingford, Oxon, UK: CAB International.
17. KYVSGAARD N.C. & MURRELL K.D. (2005). Prevention of taeniosis and cysticercosis. In: WHO/FAO/OIE Guidelines for the Surveillance, Prevention and Control of Taeniosis/Cysticercosis, Murrell K.D. ed. OIE, Paris, 57–72.
18. LIGHTOWLERS M.W. (2006) Vaccines against cysticercosis and hydatidosis: foundations in taeniid cestode immunology. *Parasit. Int.*, **55**, S39–S43.
19. LIGHTOWLERS M.W., COLEBROOK A.L., GAUCI C.G. , GAUCI S.M., KYNGDON C.T., MONKHOUSE C., VALLEJO RODRIQUEZ C., READ A.J., ROLFE R.A. & SATO C. (2003). Vaccination against cestode parasites: anti-helminth vaccines that work and why. *Vet. Parasitol.*, **115**, 83–123.
20. LIGHTOWLERS M.W. & GAUCI C.G. (2001). Vaccines against cysticercosis and hydatidosis. *Vet. Parasitol.*, **101**, 337–352.
21. LLOYD S. (1998). Cysticercosis and taeniosis *Taenia saginata*, *Taenia solium* and Asian *Taenia*. In: Zoonoses. Biology, Clinical Practice, and Public Health Control, Palmer S.R., Lord Soulsby E.J.L. & Simpson D.I.H., eds. Oxford University Press, Oxford, UK, 635–649.
22. LLOYD S. (1998). Other cestode infections. Hymenolepsis, diphyllbothriosis, coenurosis, and other adult and larval cestodes. In: Zoonoses. Biology, Clinical Practice, and Public Health Control, Palmer S.R., Lord Soulsby E.J.L. & Simpson D.I.H., eds. Oxford University Press, Oxford, UK, 651–663.
23. LLOYD S., MARTIN S.C., WALTERS T.M.H. & SOULSBY E.J.L. (1991). Use of sentinel lambs for early monitoring of the South Powys Hydatidosis Control Scheme: prevalence of *Echinococcus granulosus* and some other helminths. *Vet. Rec.*, **129**, 73–76.

24. LOOS-FRANK B. (2000). An up-date of Verster's (1969) 'Taxonomic revision of the genus *Taenia*' (Cestoda) in table format. *Syst. Parasitol.*, **45**, 155–183.
25. MAYTA H., TALLEY A., GILMAN R.H., JIMENEZ J., VERASTEGUI M., RUIZ M., GARCIA H.H. & GONZALEZ A.E. (2000). Differentiating *Taenia solium* and *Taenia saginata* infections by simple haematoxylin–eosin staining and PCR-restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 133–137.
26. NASH T.E. (2005). Clinical cysticercosis: diagnosis and treatment. In: WHO/FAO/OIE Guidelines for the Surveillance, Prevention and Control of Taeniosis/Cysticercosis, Murrell K.D. ed. OIE, Paris, 11–25.
27. OGUNREMI O., MACDONALD G., GEERTS S. & BRANDT J. (2004). Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis by immunohistochemical test on formalin-fixed and paraffin-embedded bovine lesions. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **16**, 438–441.
28. ONYANGO-ABUJE J.A., HUGHES G., OPICHA M., NGINYI K.M., RUGUTT M.K., WRIGHT S.H. & HARRISON L.J. (1996). Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenyan cattle by antibody and antigen ELISA. *Vet. Parasitol.*, **61**, 221–230.
29. SCIUTTO E., HERNANDEZ M., GARCIA G., DE ALUJA A.S., VILLALOBOS A.N., RODARTE L.F., PARKHOUSE M. & HARRISON L. (1998). Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. *Vet. Parasitol.*, **78**, 185–194.
30. SCIUTTO E., MARTINEZ J.J., VILLALOBOS N.M., HERNANDEZ M., JOSE M.V., BELTRAN C., RODARTE F., FLORES I., BOBADILLA J.R., FRAGOSO G., PARKHOUSE M.E., HARRISON L.J. & DE ALUJA A.S. (1998). Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet. Parasitol.*, **79**, 299–313.
31. SCIUTTO E., ROSAS G., HERNANDEZ M., MORALES J., CRUZ-REVILLA C. TOLEDO A., MANOUTCHARIAN K., GEVORKIAN G., BLANCAS A., ACERO G., HERNANDEZ B., CERVANTES J., BOBES R.J., GOLDBAUM F.A., HUERTA M., DIAZ-OREA A., FLEURY A., DE ALUJA A.S., CABRERA-PONCE J.L., HERRERA-ESTRELLA L., FRAGOSO G. & LARRALDE C. (2007). Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. *Vaccine*, **25**, 1368–1378.
32. SOULSBY E.J.L. (1982). Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, Seventh Edition. Balliere Tindall, London, UK, 809 p.
33. VAN KERCKHOVEN I., VANSTEENKISTE W., CLAES M., GEERTS S. & BRANDT J. (1998). Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. *Vet. Parasitol.*, **76**, 269–274.
34. VERSTER A. (1969). A taxonomic revision of the genus *Taenia* Linnaeus 1758 s. str. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **37**, 3–58.
35. WALTHER M. & KOSKE J.K. (1980). *Taenia saginata* cysticercosis: a comparison of routine meat inspection and carcass dissection results in calves. *Vet. Rec.*, **106**, 401–402.
36. WANZALA W., ONYANGO-ABUJE J.A., KANG'ETHE E.K., ZESSIN K.H., KYULE N.M., BAUMANN M.P., OCHANDA H. & HARRISON L.J. (2003). Control of *Taenia saginata* by post-mortem examination of carcasses. *Afr. Health Sci.*, **3** (2), 68–76.

*
* *

MALADIES DUES AUX VIRUS HENDRA ET NIPAH

RÉSUMÉ

Le virus Hendra (HeV) et le virus Nipah (NiV) ont émergé durant la dernière décennie du 20^e siècle en tant qu'agents responsables d'épidémies de maladie respiratoire et neurologique qui infectent plusieurs espèces animales. En 1994, le HeV causait une maladie respiratoire sévère et la mort de 13 chevaux et d'un entraîneur de chevaux dans une écurie à Brisbane en Australie. Entre septembre 1998 et avril 1999, après dissémination d'une infection respiratoire ou encéphalitique non reconnue chez des porcs en Malaisie, le NiV est apparu dans la population humaine locale comme une cause d'encéphalite mortelle. HeV a entraîné la mort de 2 personnes tandis que 400 cas humains de NiV ont été signalés ayant entraîné environ 200 décès, en Malaisie, à Singapour, au Bangladesh et en Inde. Les chauves-souris frugivores (« flying foxes ») du genre Pteropus sont les hôtes naturels des deux virus.

L'infection au HeV chez le cheval est caractérisée par une fièvre importante, de la sudation faciale, des difficultés respiratoires sévères et, enfin, un jetage nasal abondant et mousseux. Quelques chevaux présentent des signes neurologiques. Les observations post mortem les plus fréquentes sont la dilatation des vaisseaux lymphatiques pulmonaires, un œdème pulmonaire sévère et de la congestion. La lésion sous-jacente est une dégénérescence généralisée des petits vaisseaux sanguins dans beaucoup d'organes. Des syncytiums de cellules endothéliales contenant de l'antigène viral sont fréquemment observés dans les capillaires et les artérioles. L'infection des chevaux par le HeV n'est pas toujours fatale et certains chevaux manifestant des signes cliniques peuvent survivre à l'infection. Des expériences de transmission en laboratoire ont montré que le HeV n'est pas facilement transmis entre chevaux. Ce résultat correspond à l'observation faite au cours de l'épizootie d'origine où l'infection ne s'était pas disséminée largement aux chevaux des propriétés voisines.

L'infection par le NiV des porcs est fortement contagieuse, mais elle n'a pas été identifiée initialement comme une nouvelle maladie parce que la morbidité et la mortalité n'étaient pas marquées et que les signes cliniques n'étaient pas significativement différents des autres maladies porcines connues. Les observations faites durant l'investigation de l'épizootie et durant des infections expérimentales confirment que l'infection des porcs par le NiV est caractérisée par de la fièvre avec atteinte du système respiratoire. Chez les animaux qui extériorisent la maladie ; les signes nerveux ont été fréquemment décrits mais de nombreuses infections passent inaperçues. Certains animaux infectés présentent une toux sèche inhabituelle. De l'avortement est décrit chez les truies. Des lésions immunohistochimiques sont visibles sur le système respiratoire (trachéite, bronchite et pneumonie interstitielle) et/ou le cerveau des animaux infectés. Des syncytiums cellulaires contenant de l'antigène viral sont observés dans les petits vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques et l'épithélium respiratoire.

Les deux virus peuvent atteindre les animaux de compagnie. Le HeV cause des maladies respiratoires chez le chat semblables à celles observées chez les chevaux. L'infection naturelle des chiens avec le NiV cause un syndrome semblable à la maladie de Carré avec un taux de mortalité élevé ; des arguments sérologiques existent qui laissent à penser que certains chiens survivent à l'infection. Expérimentalement, le NiV cause une maladie similaire au HeV chez les chats. Les syncytiums de cellules endothéliales contenant de l'antigène viral ont été observés dans des infections par le HeV et le NiV chez le chat et dans des infections par le NiV chez les chiens.

Les hommes contractent l'infection par contact direct, habituellement plutôt à partir d'un hôte amplificateur (le porc pour le NiV et les chevaux pour le HeV) que directement à partir de l'hôte réservoir. Néanmoins, les recherches sur les foyers humains à NiV au Bangladesh ont montré que

les hommes pouvaient s'infecter à partir des chauves-souris *Pteropid*. La transmission d'homme à homme n'a pas été observée ni avec le HeV ni avec le NiV en Malaisie ou à Singapour, mais une transmission d'homme à homme est suspectée dans les récents foyers d'infection par le NiV au Bangladesh.

Le HeV et le NiV sont des membres très proches de la famille des Paramyxoviridae. Les différences entre eux et les autres membres de la famille ont conduit à leur classification dans un nouveau genre : les Henipavirus, dans la sous famille des Paramyxovirinae. Le HeV et le NiV sont des agents de niveau 4 de biosécurité. Il est important que les échantillons provenant d'animaux suspects soient uniquement transportés vers des laboratoires autorisés sous conditions de sécurité biologique en accord avec des réglementations internationales.

Identification de l'agent pathogène : le HeV et le NiV peuvent être propagés sur une série de lignées cellulaires. L'isolement du virus à partir d'échantillon de terrain peut être tenté, mais seulement en situation où la sécurité de l'opérateur peut être assurée. Les procédures d'identification suivent l'isolement du virus et comprennent des colorations immunohistochimiques des cellules infectées, la neutralisation par un antisérum spécifique et la caractérisation moléculaire. Une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) est maintenant disponible pour le diagnostic.

L'antigène viral est présent dans l'endothélium vasculaire, et dans le cas du NiV chez le porc on en retrouve au niveau de l'épithélium respiratoire. Une large gamme de tissus fixés avec du formol peut être examinée pour détecter les antigènes du HeV et de NiV. Les échantillons soumis à l'immunohistochimie doivent inclure du cerveau (y compris les méninges), du poumon, de la rate et du rein. Chez les animaux gestants ou en cas d'avortement, l'utérus, le placenta et les tissus fœtaux doivent être inclus. Les échantillons pour l'isolement et la détection moléculaire du virus doivent être des tissus récemment collectés à partir des mêmes organes que ci-dessus, ou de l'urine ou des écouvillonnages nasaux.

Épreuves sérologiques : les tests de séroneutralisation virale (SN) et immuno-enzymatiques (ELISA) sont disponibles. Le test de SN est couramment considéré comme la méthode de référence. Les antisérums dirigés contre HeV et NiV ne présentent de la neutralisation croisée que jusqu'à un certain degré. Aussi une simple SN utilisant l'un des deux virus ne donne pas une identification définitive de la spécificité des anticorps. Les anticorps neutralisants envers le HeV et le NiV peuvent être différenciés par leur plus grande capacité à neutraliser le virus homologue que le virus hétérologue. Ceci ne devrait pas être un obstacle majeur en situation épidémique où l'agent causal est connu, mais les échantillons de sérum provenant de cas suspects ou provenant de région du monde autre que l'Australie et la Malaisie doivent être soumis à des tests de VNT avec les deux virus, HeV et NiV. L'apparenté sérologique entre le HeV et le NiV assure que l'ELISA utilisant des antigènes du HeV ou du NiV peut être utilisé pour détecter des anticorps des deux virus.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : il n'y a pas de vaccin actuellement disponible pour HeV et NiV.

A. INTRODUCTION

Le virus de Hendra (HeV) et le virus de Nipah (NiV) sont des virus des chauves-souris frugivores communément connues comme « *flying foxes* », membres du genre *Pteropus*. Des anticorps contre le HeV sont trouvés chez approximativement 50 % des 4 espèces de *Pteropus* australien (35). Des enquêtes sérologiques des anticorps contre NiV ont mis en évidence des prévalences de près de 20 % chez les chauves-souris *Pteropid* de Malaisie (10, 18). Des anticorps contre NiV ou contre d'éventuels virus étroitement apparentés ont été détectés chez des chauves-souris *Pteropid* au Bangladesh (15), au Cambodge (24, 27), en Indonésie (29), à Madagascar (19) et en Thaïlande (31). Le HeV a aussi été isolé de « *flying foxes* » australiens (12), et le NiV a été isolé à partir de chauves-souris en Malaisie et au Cambodge (4, 27). L'ARN du NiV a été détecté par amplification en chaîne par polymérase (PCR) dans de l'urine, de la salive et du sang de chauve-souris *Pteropid* en Thaïlande (30, 31).

Le HeV a émergé à Brisbane, en Australie, en septembre 1994 comme la cause d'un foyer de maladie respiratoire aiguë qui a tué 13 chevaux et un entraîneur (22). Le virus était initialement nommé morbillivirus équin, mais les analyses génétiques subséquentes ont indiqué qu'il ne ressemblait pas assez à un morbillivirus pour permettre l'insertion dans ce genre. Il y a eu d'autres cas d'infection mortelle à HeV chez des chevaux au Nord du

Queensland avec des infections humaines subséquentes. Deux chevaux ont développé une maladie aiguë et sont morts environ 1 mois avant l'épidémie de Brisbane, mais le HeV a été incriminé seulement après l'infection d'un propriétaire de chevaux, qui a probablement été infecté par le HeV durant l'autopsie. Il est décédé 13 mois plus tard d'une encéphalite due au HeV (28). Un troisième cheval est mort en janvier 1999 sans maladie humaine associée (11). Deux autres cas équins sont survenus en 2004 (l'un confirmé l'autre non) ; le cas non confirmé a été associé à une infection humaine (13). En 2006, deux autres cas ont été signalés en Australie, un dans l'état de Southern Queensland et l'autre dans le nord de l'état de New South Wales. Tous les foyers enregistrés depuis 1995 ont impliqué seulement un cheval au pâturage sans transmission aux animaux en contact.

Des études rétrospectives d'échantillons histologiques archivés indiquent que le NiV a causé une faible mortalité chez les porcs de Malaisie depuis 1996, mais est resté inconnu jusqu'en 1999 lorsqu'il a été responsable d'une épidémie d'encéphalite chez les humains qui avait commencé en 1998 (3, 23). Contrairement à la maladie respiratoire causée par le HeV chez les chevaux qui est fréquemment fatale mais caractérisée par une faible contagiosité (33), la maladie respiratoire causée par le NiV chez le porc était souvent subclinique mais fortement contagieuse. Ces propriétés ont conduit à une dispersion rapide du virus à travers la population de porcs malaisiens et ont obligé les autorités à choisir l'abattage comme le premier moyen pour contrôler la dispersion (23). Environ un million de porcs ont été détruits ; 106 des 267 humains infectés sont morts d'encéphalite, principalement des éleveurs de porcs en Malaisie et des employés d'abattoir à Singapour. Ces personnes avaient des contacts directs avec les porcs vivants (3, 26).

Par la suite, de nouveaux foyers de maladie humaine due au NiV sont déclarés au Bangladesh et en Inde. Dans les foyers de 2001 et 2003, aucun animal n'a été retrouvé comme source de l'infection humaine (15), mais des chauves-souris *Pteropus*, *Pteropus giganteus*, étaient présentes et possédaient des anticorps capables de neutraliser le virus Nipah. Des études séquentielles et de regroupement de cas ont montré qu'une transmission d'homme à homme est possible mais à un faible niveau (15). Lors d'un autre foyer en 2004 au cours duquel 27 patients sont morts sur 36 infectés, des études épidémiologiques ont démontré la transmission de personne à personne et des enquêtes sérologiques ont mis en évidence des anticorps chez les chauves-souris frugivores présentes sur les lieux (1). La boisson de vin de palme contaminé par la salive, l'urine ou les excréments de chauve souris frugivores a été reconnue comme une voie possible de transmission de l'infection de la faune sauvage à l'homme (20). Au vu de ces foyers en Malaisie, à Singapour, au Bangladesh et en Inde, on estime le nombre de cas humains du au NiV à au moins 400 cas humains, ayant occasionné la mort d'environ 200 personnes.

Au plan taxonomique, le NiV et le HeV sont considérés comme des paramyxovirus, dans la sous-famille des Paramyxovirinae, et ont été regroupés en un nouveau genre, les henipavirus (9).

Le diagnostic d'une maladie causée par un henipavirus se fait par isolement viral, par détection de l'ARN viral dans les échantillons cliniques, ou par détection d'antigène viral dans les échantillons de tissus prélevés à l'autopsie (8). La détection d'anticorps spécifiques peut aussi être utile particulièrement chez les porcs où l'infection par le NiV n'est pas remarquée. L'identification des anticorps contre le HeV chez les chevaux est moins utile vu le taux élevé de cas mortels dans cette espèce. Il a été possible de diagnostiquer rétrospectivement par sérologie les infections humaines dues au NiV ou au HeV. La présence d'anticorps spécifiques contre le HeV ou le NiV, tant chez l'animal que chez l'homme, constitue un élément diagnostique significatif en raison de la rareté de l'infection et de l'implication zoonotique grave de la transmission de l'infection.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

a) Isolement du virus et caractérisation

Le HeV et le NiV sont classés comme des agents de niveau de biosécurité 4 (BSL4), du fait qu'ils sont de dangereux agents pathogènes pour l'homme entraînant un taux de mortalité élevé et pour lesquels il n'existe pas de vaccin ou de traitement antiviral efficace. Le niveau BSL4 est semblable au groupe de confinement 4 décrit dans les directives de biosécurité déterminées par l'OIE dans le Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries ». Des informations complémentaires sont également mentionnées dans ce chapitre. Cependant, en raison du risque important d'infection humaine dans le laboratoire, les conditions BSL4 surpassent les conditions de confinement de niveau 4 de l'OIE. L'isolement du virus facilite fortement les procédures d'identification. Le diagnostic définitif ne devrait être réalisé que lorsque la sécurité de l'opérateur peut être garantie. L'isolement est spécialement pertinent dans tout nouveau cas ou nouvelle épidémie, particulièrement dans les pays ou les régions géographiques où l'infection par le HeV ou le NiV n'a pas été documentée auparavant. La preuve que les espèces sauvages agissent comme hôtes naturels du virus demande soit

une réponse sérologique positive, soit l'identification positive par PCR, soit l'isolement à partir d'animaux capturés (7).

i) **Échantillonnage et traitement des échantillons**

Les échantillons pour le diagnostic doivent être envoyés vers un laboratoire agréé dans des containers spéciaux. Selon l'association internationale de transport aérien (IATA), la réglementation pour les marchandises dangereuses (DGR, *Dangerous Goods Regulations*) doit être respectée pour l'envoi d'échantillons provenant d'une maladie zoonotique suspecte (17). Les conditions sont résumées dans le Chapitre 1.1.1., « Prélèvement et expédition des échantillons pour le diagnostic ».

Les tissus produisant du virus dans les cas naturels et expérimentaux ont été résumés (6). Le cerveau, le poulmon, le rein et la rate doivent toujours être envoyés. Les échantillons doivent être transportés sur de la glace ou à 4 °C s'ils peuvent arriver au laboratoire dans les 48 h suivant la collecte. Si le temps de transport est supérieur, les échantillons seront envoyés congelés sur carboglace ou dans des vapeurs d'azote liquide. Ils ne doivent pas être maintenus à –20 °C pendant une longue période.

ii) **Isolement en culture de cellules**

La propagation du virus doit être conduite sous conditions de biosécurité de niveau 4. Le respect strict de cette condition limite les possibilités d'analyse d'échantillons à diagnostiquer quand la présence de HeV ou NiV peut être suspectée. Dès lors, l'isolement du virus à partir d'échantillons suspects peut être conduit si nécessaire sous conditions de biosécurité de niveau 3. Cependant, si ceci est tenté, des directives locales rigoureuses doivent être respectées pour assurer la sécurité de l'opérateur et appliquées si un « paramyxovirus-like » à effet cytopathogène (ECP) se développe dans les cultures infectées. De telles directives seront en accord avec les bonnes pratiques de laboratoire, et l'utilisation soit d'enceinte de sécurité biologique de classe II avec des combinaisons appropriées pour le personnel, soit d'enceinte de sécurité biologique de classe III. Il faut exiger une fixation à l'acétone des cellules infectées, pour détruire le virus infectieux, et pour ensuite permettre la détection par immunofluorescence des antigènes d'Henipavirus. Le milieu de culture provenant de cellules positives au Henipavirus doit être transféré dans un laboratoire de biosécurité de niveau 4.

Au laboratoire receveur, les tissus sont manipulés en conditions stériles, et des suspensions à 10 % (w/v) sont générées en broyant les tissus dans un système d'homogénéisation fermé, par exemple un stomacher/mélangeur utilisant un récipient en plastique ou un mélangeur broyeur utilisant des billes d'acier autoclavables dans des cylindres métalliques fermés. Toutes les manipulations doivent être réalisées dans des enceintes de sécurité biologique de classe III ou de classe II si le personnel est protégé de façon appropriée, le stomacher et les pots de centrifugation étant remplis et vidés dans l'enceinte. Ensuite, après clarification de l'homogénat par centrifugation à 300 g, le surnageant est ajouté à une culture de cellules en monocouche. L'isolement du virus est facilité par le fait que les HeV et NiV se multiplient rapidement à haut titre en culture de cellules. Les cellules rénales de singe vert africain (Vero) et de lapin (RK-13) sont particulièrement sensibles. Le HeV se réplique aussi sur cerveau de souriceau non sevré et sur œufs embryonnés. Bien que le premier soit une méthode valable pour l'isolement primaire, il n'y a pas de données sur la sensibilité relative des systèmes *in vivo*. La sensibilité de l'isolement en culture de cellules a, quant à elle, été testée. Un ECP se développe habituellement en 3 jours, mais un deuxième passage après 5 jours est recommandé avant de déclarer un échantillon négatif. En condition de faible multiplicité d'infection, l'ECP est caractérisé par la formation de syncytiums qui peuvent, après 24 à 48 h, contenir 60 noyaux ou plus. Les syncytiums formés par le NiV sur les monocouches de cellules Vero sont significativement plus grands que ceux induits par le HeV pendant le même délai. La distribution des noyaux dans les syncytiums induits par le NiV au début de l'infection ressemble à celle induite par le HeV, avec les noyaux agglomérés au centre du syncytium. Ensuite, les noyaux dans les syncytiums mûrs induits par le NiV sont distribués au pourtour de la cellule géante (16).

iii) **Méthodes d'identification**

• **Coloration immunologique des cellules fixées**

La vitesse avec laquelle le HeV et le NiV se réplique et la forte concentration d'antigène viral générée dans les cellules infectées fait de l'immunofluorescence une méthode de choix pour identifier rapidement la présence d'Henipavirus par l'utilisation des sérums anti-NiV ou anti-HeV. A l'heure actuelle, le genre *Henipavirus* ne comprend que le HeV et le NiV et il n'y a pas d'autre virus antigéniquement semblable connu.

La réaction sérologique croisée entre les HeV et NiV signifie qu'un antisérum polyclonal envers l'un et l'autre virus ou un antisérum mono-spécifique contre des protéines individuelles de l'un et de l'autre virus, ne peut pas faire la différence entre le HeV et le NiV. Des anticorps monoclonaux (AcM) ont été générés et testés pour remplir cette fonction dans l'identification primaire du virus lors d'isolement. Ces AcMs sont aussi utilisés pour des examens immunohistochimiques de tissus provenant de cas suspects.

- **Protocole**

En condition de biosécurité L4, les monocouches de cellules Vero ou RK-13 qui ont été cultivées sur des lames couvre-objet en verre ou sur une plaque sont infectées avec le virus isolé. Les monocouches sont analysées pour détecter la présence de syncytium après incubation de 24 à 48 h à 37 °C. Il est recommandé qu'une série de dilution virale (non dilué, 1/10, 1/100) soit testée car les syncytiums sont plus facilement observés après infection à faible multiplicité. Une fois que les syncytiums sont détectés, les cellules infectées sont fixées par immersion dans un récipient d'acétone. Le récipient est fermé hermétiquement et la surface externe est stérilisée avant de déplacer le prélèvement vers un endroit du laboratoire moins sécurisé, par exemple de niveau L2, où les plaques sont séchées à l'air. L'antigène viral est mis en évidence par un antisérum anti-HeV ou anti-NiV et suivant les procédures normalisées d'immunofluorescence. Une caractéristique des syncytiums induits par les Henipavirus est la présence de grandes structures polygonales contenant l'antigène viral. Cela est plus facilement observé avec des anticorps monospécifiques et des AcMs dirigés contre la protéine de la nucléocapside N et de la phosphoprotéine P.

- **Immuno-microscopie électronique**

Le titre élevé généré par les HeV et NiV dans les cellules *in vitro* permet leur visualisation dans le milieu de culture par microscopie électronique en contraste de phase négatif sans étape de concentration par centrifugation. La détection de complexes virus-anticorps par immuno-microscopie électronique fournit des informations précieuses sur la structure du virus et la réactivité antigénique, même durant le premier isolement du virus. D'autres techniques ultrastructurales sont possibles. La culture cellulaire sur grille peut être réalisée (13). Dans cette technique, les cellules sont cultivées, infectées et visualisées sur des grilles au microscope électronique. Il est aussi possible d'identifier la réplication des virus et des corps d'inclusion dans des coupes ultrafines de cultures cellulaires fixées. Le détail de ces techniques et leur application dans la détection et l'analyse des HeV et NiV ont été décrits (16).

b) Test de séroneutralisation virale : différenciation entre HeV et NiV

Les tests de neutralisation reposent sur des méthodes de quantification. Trois procédures sont disponibles pour titrer les HeV et NiV. Dans les méthodes de plages et de microtitrage traditionnelles, le titre est calculé respectivement par la technique des unités formant plages (UFP) et par la dose infectieuse capable de causer un ECP dans 50 % des puits inoculés (DICT₅₀). Dans une procédure alternative, les virus sont titrés sur des monocouches de cellules Vero dans des plaques de 96 puits. Après 18 à 24 h, les foyers d'infection sont détectés immunologiquement sur les cellules fixées à l'acétone en utilisant un sérum anti-viral (5). Le titre viral est exprimé comme une unité formant un foyer (UFF)/ml.

Les tests de séroneutralisation utilisant ces 3 méthodes sont décrits plus loin. Un isolat viral qui réagit avec un antisérum anti-HeV et/ou anti-NiV dans un test d'immunofluorescence est considéré comme sérologiquement identique à l'un et l'autre HeV ou NiV s'il présente la même sensibilité à la neutralisation par un antisérum anti-HeV et anti-NiV. L'antisérum anti-HeV neutralise le HeV à une dilution généralement 4 fois plus grande que celle qui neutralise le NiV. Réciproquement, l'antisérum anti-NiV neutralise le NiV approximativement 4 fois plus efficacement que le HeV (3). Les techniques de titrage du virus doivent être réalisées dans des conditions de confinement de niveau 4 (BSL 4). Une nouvelle version du test de séroneutralisation différentielle a été décrite récemment qui évite la manipulation de virus infectieux par l'emploi de microbilles liées à l'éphrine-B2 (2). Bien que ce test doive encore être validé formellement, il apparaît d'ores et déjà comme un outil de criblage utile dans les pays qui ne possèdent pas de structures de confinement de niveau 4.

i) **Réduction du nombre de plages**

Les stocks de HeV et NiV et les échantillons d'Henipavirus non identifiés sont dilués dans un milieu. Les réplicats de chaque virus contenant approximativement 100 UFP dans 50 à 100 µl sont mélangés avec un volume égal constitué soit d'un milieu minimum essentiel de Eagle (EMEM), soit d'une série de dilutions d'antisérum anti-HeV ou anti-NiV dans du EMEM. Les mélanges virus-antisérum sont incubés à 37 °C pendant 45 min. Après cette incubation, les mélanges virus-dilutions sériques sont adsorbés sur des monocouches de cellules Vero à 37 °C pendant 45 min. Le nombre de plages est déterminé par des méthodes traditionnelles de plages après incubation à 37 °C pendant 3 jours.

ii) **Neutralisation par microtitrage**

Les HeV et NiV de stock et les échantillons d'Henipavirus non identifiés sont dilués de manière à obtenir des réplicats de chaque virus contenant approximativement 100 UFP dans 50 à 100 µl. Ces suspensions virales sont déposées dans des puits tests d'une plaque microtitre de 96 puits à fond plat. Les suspensions virales sont mélangées avec un volume égal de EMEM ou une série de dilutions d'antisérum anti-HeV ou anti-NiV dans du EMEM. Les mélanges sont incubés à 37 °C pendant 45 min. Après cette incubation, on ajoute environ $2,4 \times 10^4$ cellules à chaque puits pour atteindre un volume

final d'environ 200 µl. Après 3 jours à 37 °C, le test est lu en utilisant un microscope inversé et les puits sont évalués selon le degré d'ECP observé. Ceux qui contiennent uniquement des cellules ou des cellules et de l'antisérum ne doivent pas montrer d'ECP. Au contraire, les puits contenant des cellules et du virus doivent montrer des syncytiums et une destruction cellulaire. Un puits est considéré positif lorsque toutes les cellules de la monocouche ou une proportion d'entre elles forment des larges syncytiums typiques d'une infection à Henipavirus.

iii) *Coloration immunologique des plages*

Des cellules Vero (2×10^4 dans 200 µl de milieu/puits) sont déposées dans des plaques à fond plat et sont cultivées durant la nuit à 37 °C. Les virus HeV et NiV de stock et les échantillons d'Henipavirus non identifiés sont dilués. Les réplicats contenant environ 60 FFU/50 µl sont mélangés avec un volume égal soit de EMEM, soit d'une série de dilutions d'antisérum anti-HeV et anti NiV diluées dans du EMEM. Les mélanges virus-antisérum sont incubés pendant 45 min à 37 °C. Après cette incubation, ils sont adsorbés aux monocouches de cellules Vero pendant 45 min à 37 °C. Les mélanges virus-antisérum sont enlevés, 200 µl de EMEM sont ajoutés à chaque puits et l'incubation se poursuit à 37 °C. Après 18 à 24 h, le milieu de culture est aspiré et les plaques sont immergées dans de l'acétone pure froide pendant 10 min. Elles sont ensuite placées dans des bacs en plastique, qui sont remplis avec de l'acétone scellés à chaud et dont la surface est stérilisée avec 4 % (v/v) de lysol avant le retrait hors du laboratoire de niveau L4. Le glutaraldéhyde peut aussi être utilisé pour la stérilisation à une concentration de 0,1 % pendant 24 h. Il est recommandé que chaque laboratoire détermine la concentration de glutaraldéhyde nécessaire pour la stérilisation dans un intervalle de temps requis. Les plaques fixées à l'acétone sont séchées à l'air, les puits sont remplis avec une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) contenant 0,05 % de Tween 20 et 2 % de poudre de lait écrémé. Ils sont incubés pendant 30 min à 37 °C avec soit un antisérum de HeV ou NiV soit un sérum monospécifique d'une protéine virale. Les anticorps anti-viraux liés aux syncytiums peuvent être détectés en utilisant un anticorps spécifique d'espèce conjugué à une phosphatase alcaline et le substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate et un substrat *p*-nitro bleu tétrazolium (NBT/BCIP ; Proméga, Numéro dans le catalogue S3771). Lorsque des plages violettes apparaissent sur un arrière plan clair (10-30 min), le substrat est enlevé et les plaques sont rincées avec de l'eau distillée et séchées à l'air. Les plages sont comptées en utilisant une loupe binoculaire.

c) **Méthodes de reconnaissance basée sur les acides nucléiques**

Les génomes des deux virus HeV et NiV ont été entièrement séquencés (32), et des méthodes basées sur des PCR ont été utilisées pour détecter les virus et ont été validées dans un certain nombre de laboratoires.

La PCR en temps réel apparaît être une approche sensible et utile pour la détection du génome d'henipavirus dans les échantillons. En termes de sécurité, cette méthode présente l'avantage de ne pas nécessiter la multiplication de virus infectieux vivant. Les protocoles et les amorces dépendent du plateau technique et des produits chimiques disponibles dans les laboratoires (21, 30). Les réactifs spécifiques du virus pour une telle épreuve basée sur la Taqman sont présentés ci-dessous (21) :

Pour la détection du virus Hendra :		
Amorce n°1	(HENDRA-N1433F)	5'-ATC-TCA-GAT-CCA-GAT-TAG-CTG-CAA-3'
Amorce n°2	(HENDRA-N1572R)	5'-ATC-ATT-TTG-GGC-AGG-TTT-GG-3'
Sonde TaqMan	(HENDRA-N1510T-FAM)	5'-6FAM-AAC-CGC-CCT-CAG-GCA-GAC-TCA-GGA-TAMRA-3'
Pour la détection du virus Nipah :		
Amorce n°1	(Nipah-N1198F)	5'-TCA-GCA-GGA-AGG-CAA-GAG-AGT-AA-3'
Amorce n°2	(Nipah-N1297R)	5'-CCCCTTCATCGATATCTTGATCA-3'
Sonde TaqMan	(Nipah-1247comp-FAM):	5'-6FAM-CCT-CCA-ATG-AGC-ACA-CCT-CCT-GCA-G-TAMRA-3'

Les laboratoires désireux de réaliser des méthodes moléculaires pour la détection doivent se référer aux protocoles publiés ou contacter le Laboratoire de référence de l'OIE.

d) Détection d'antigènes d'Henipavirus dans des tissus fixés pour immunohistochimie

L'immunohistochimie s'est révélé être une des épreuves les plus utiles dans la détection des virus HeV et NiV. Effectuée sur des tissus ou des cellules fixées au formol, cette méthode offre l'avantage d'être sûre du point de vue de la biosécurité. Elle permet par ailleurs des investigations rétrospectives sur du matériel archivé. Comme la réplication virale et la lésion primaire se produisent dans l'endothélium vasculaire (14), il existe une large gamme de tissus dans lesquels les antigènes des HeV et NiV peuvent être détectés (8). Étant donné que les antigènes du HeV peuvent être éliminés des tissus pulmonaires dans les phases précoces de l'infection, les échantillons soumis doivent inclure une série de tissus, pas uniquement du poumon. L'antigène du HeV a été détecté dans le rein d'un cheval 21 jours après infection (33). Cet organe doit donc toujours être soumis au test. Idéalement une soumission pour l'immunohistochimie doit inclure des échantillons de différentes parties du cerveau, du poumon, des nœuds lymphatiques médiastinaux, de la rate et du rein. Chez les animaux gestants, l'utérus, le placenta et des tissus fœtaux doivent être inclus.

Plusieurs antisérums anti-HeV et NiV peuvent être utilisés dans les études immunohistochimiques des tissus infectés par HeV et NiV, mais les sérums de lapin anti HeV et NiV purifiés par la méthode des plages se sont révélés être particulièrement efficaces. Quelques AcMs sont aussi disponibles. Le Groupe de travail sur le virus Nipah a décrit un système de détection (34). Un système de détection biotine-streptavidine lié à une peroxydase a été utilisé avec succès dans le passé (14). Le système de détection préféré est un réactif lié à un polymère dextran anti-lapin/anti-souris conjugué à une phosphatase alcaline.

- **Protocole**

- i) Déparaffiner les lames contenant le matériel à éprouver fixé dans le formol et intégré dans de la paraffine et des coupes de tissus témoins positif et négatif par immersions répétées 3 fois dans du xylène pendant 1 min. Hydrater les sections par 2 bains successifs d'éthanol 98 à 100 %, un bain de 70 % d'éthanol et d'eau courante du robinet pour enlever l'alcool résiduel ;
- ii) Rincer les lames dans de l'eau distillée, immerger dans 0,01 M de CaCl_2 (ajusté à pH 7,8 avec 0,1 M d'hydroxyde de sodium) contenant 0,1 % (w/v) de trypsine (Difco Trypsin 250) pendant 20 min à 37 °C et laver à l'eau distillée ;
- iii) Étendre les lames à plat dans une chambre humide et rincer avec du PBS pendant 5 min. Ajouter 200 µl d' H_2O_2 aqueuse 3 % à chaque lame pendant 20 min à température ambiante, pour bloquer l'activité peroxydase endogène. Rincer les lames dans du PBS pendant 5 min ;
- iv) Ajouter 200 µl d'une dilution appropriée d'anticorps de lapin anti-HeV ou NiV dans du PBS contenant 0,1 % (w/v) de poudre de lait écrémé pour tester les lames de tissus et les lames témoin positif et négatif. Ajouter à la série de tests et aux lames témoin positif et négatif des anticorps de lapin dirigés contre un agent pathogène différent. Couvrir les lames et incuber à 37 °C pendant 1 h ;
- v) Rincer les lames dans du PBS pendant 5 min et appliquer 2 à 3 gouttes de solution d'Envision™ (immunoglobuline anti-lapin conjuguée à un polymère dextran marqué d'une peroxydase [DAKO corporation, 6392 Via Real Carpinteria, CA03013]). Incuber à 37 °C pendant 20 min ;
- vi) Préparer le substrat en dissolvant 2 mg de 3-amino-9-éthylcarbazole (AEC) dans 200 µl de diméthyl formamide (Merck) et ajouter à 10 ml d'un tampon acétate 0,02 M, pH 5,0. Ajouter 5 µl d' H_2O_2 (30 % w/v) et mélanger. Vérifier la lame témoin positive pour une coloration suffisante, habituellement durant 2 à 5 min, et stopper la réaction en rinçant à l'eau distillée. La solution de substrat doit être gardée au frais avant utilisation ;
- vii) Colorer les lames dans de l'hématoxyline pendant 1 à 3 min, rincer à l'eau du robinet, ajouter de la solution de Scott (0,04 M de bicarbonate de sodium et 0,3 M de sulfate de magnésium), et bien laver à l'eau courante du robinet. Rincer les lames dans de l'eau distillée et couvrir avec une lame couvre objet en utilisant un milieu de montage aqueux ;
- viii) Lire les lames pour rechercher des dépôts de chromogène (rouge) dans le cytoplasme, ce qui indique la présence d'antigènes viraux. Une coloration granuleuse sera observée dans le cytoplasme des cellules positives. Le noyau cellulaire est bleu ce qui facilite l'identification de la morphologie tissulaire et aide à la localisation de l'antigène viral dans le tissu.

2. Épreuves sérologiques

Dans les laboratoires réalisant des épreuves sérologiques surtout lors d'épidémies, plusieurs stratégies ont été adoptées pour réduire le risque d'exposition du personnel de laboratoire avec le HeV et le NiV. Les sérums peuvent être irradiés aux rayons gamma (6 kiloGreys) ou dilué au 1/5 dans du PBS contenant 0,5 % de Tween 20 et 0,5 % de Triton-X100 et inactivés par la chaleur à 56 °C pendant 30 min. Le protocole choisi le sera sur la base d'une évaluation du risque. Les échantillons à des fins de surveillance et pour la certification dans le but de mouvement d'animaux sont considérés comme présentant un risque pour la biosécurité plus faible que ceux soumis pour recherche de la maladie. Dans certaines circonstances, l'inactivation par la chaleur peut être retenue

comme précaution suffisante. Cependant, il est préférable d'avoir une approche harmonisée et normalisée pour la gestion de tous les échantillons plutôt que plusieurs méthodes différentes.

a) Test de séroneutralisation du virus

Les Henipavirus peuvent être quantifiés par des tests de plaque de lyse, de microtitrage ou de plaques colorées immunologiquement. Ces tests peuvent être modifiés pour détecter les anticorps spécifiques du virus (voir ci-dessus). Le test de neutralisation virale (SN) est accepté comme étant le test de référence. Pour le test de microtitrage, réalisé sous conditions de biosécurité L4, les sérums sont incubés avec du virus dans des puits d'une plaque 96 puits. Les cellules Vero sont ajoutées après cette incubation. Les puits incubés sont examinés en commençant par la dilution 1/2. Cependant, à cette dilution, une interférence liée à la cytotoxicité du sérum peut être observée. Lorsque l'échantillon est de mauvaise qualité, ou lorsque de faibles volumes sont disponibles (comme c'est le cas avec les sérums de chauves-souris « flying fox »), une dilution initiale de 1/5 peut être utilisée. Les cultures sont lues après 3 jours d'incubation. Les sérums qui inhibent complètement le développement de l'ECP sont considérés positifs. En cas de cytotoxicité liée au sérum, le recours au test des plaques de lyse révélées par coloration en immunofluorescence est l'alternative de choix. En effet, le mélange virus/sérum est retiré de la monocouche cellulaire après la période d'adsorption. De ce fait, leur cytotoxicité a un effet limité.

b) Épreuves immuno-enzymatiques

Les antigènes d'Henipavirus produits sur cultures cellulaires utilisés dans les tests immuno-enzymatiques (ELISA) sont irradiés au moyen de 6 Kgreys avant leur incorporation. Ce traitement affecte de manière importante le titre en antigène. En 1994, pour répondre à l'épidémie initiale à Hendra virus, un ELISA indirect a été développé. L'antigène était produit à partir de cellules infectées par le HeV. Ces cultures infectées étaient soumises à plusieurs cycles de congélation-décongélation et traitées ensuite dans une solution à 0,1 % (w/v) de sodium dodécyl sulfate (P. Selleck, données non publiées). En 1999, le programme national de surveillance des porcs en Malaisie recourait à un ELISA similaire dans lequel l'antigène était obtenu par un traitement à base de détergent non ionique des cellules infectées par le NiV (6). Par la suite et afin de contrôler les niveaux élevés d'activité de liaisons non spécifiques dans les sérums porcins, un ELISA modifié a été mis au point. Celui-ci était basé sur la réactivité relative des sérums avec l'antigène du NiV par rapport à leur réactivité avec un antigène témoin obtenu par le traitement de cellules Véro non infectées. Aux *Centers for Diseases Control* à Atlanta (USA), une double approche sérologique a été mise en œuvre. Un ELISA indirect était utilisé pour la détection des IgG. Un ELISA de capture permettait quant à lui la détection des IgM. Un ELISA utilisant un antigène recombinant de la nucléocapside a été décrit pour le NiV (36), qui permet aussi de différencier entre les IgM et IgG.

La spécificité de l'ELISA indirect pour le NiV (98,4 %) (25) signifie que, dans les programmes de surveillance, le test va générer des faux positifs. Ce n'est pas un problème significatif en face d'une épidémie de NiV où une grande proportion des porcs est infectée et dont le but de la surveillance est de détecter les fermes infectées. Cependant, ce niveau de spécificité est un problème réel en dehors du contexte épidémique ou si le nombre d'échantillons à tester est limité. Si un résultat positif en ELISA était indicatif d'une véritable infection, l'absence de mesures adéquates et le délai de réponse peuvent conduire à une dispersion du virus et à des décès humains. Au contraire, les mesures de contrôle initiales excessives en réponse à un faux positif résultant de l'ELISA constitueraient une fausse alerte et des dépenses inutiles (8). L'approche courante consiste à tester tous les sérums positifs en ELISA par le test de SN, avec des sérums témoin positif au test de SN. Un test de SN de confirmation doit être fait sous conditions de biosécurité L4 et ceci peut nécessiter un envoi des échantillons dans un laboratoire reconnu.

La procédure suivante d'ELISA pour le NiV a été développée au laboratoire de santé animale d'Australie (AAHL) pour les sérums porcins et normalisée après des études en collaboration avec l'institut de recherche vétérinaire, Ipoh, Malaisie.

- **Protocole**

Préparation des antigènes de NiV

- i) Produire des cellules Vero jusqu'à ce qu'elles confluent dans un flacon roulant avec du EMEM contenant 10 % (v/v) de sérum fœtal de veau. Pour infecter le virus, verser tout le milieu sauf 5 ml de chaque flacon et, dans un laboratoire L4, ajouter du NiV purifié à une multiplicité d'infection de 0,1 DICT₅₀ par cellule.
- ii) Faire rouler les flacons roulants pendant 30 min à 33 °C pour adsorber le virus, ajouter 60 ml de EMEM contenant 10 % de sérum fœtal de veau à chaque flacon et faire tourner pendant encore 48 h à 33 °C. La multiplicité de l'infection, le temps d'incubation et la température sont choisies de sorte que peu de cellules se détachent dans le milieu de culture bien que la majorité des cellules soient infectées et incorporées dans des syncytiums après 48 h. Le milieu de culture cellulaire infecté dans ces conditions représente une excellente source de virus après purification.

- iii) Laver les monocouches de cellules infectées une fois avec du PBS 0,01 M froid et, en utilisant un large racleur, racle les cellules de chaque flacon roulant dans 5 à 10 ml de PBS refroidi sur glace.
- iv) Transférer les cellules racées dans des tubes de 50 ml conservés dans de la glace et centrifuger les cellules à 300 *g* pendant 5 min à 4 °C. Verser le PBS et resuspendre les cellules dans 0,5 ml de TNM glacé (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, pH 7,2) par flacon.
- v) Ajouter du NP 40 (détergent non ionique, Nonidet P40) à 1 % (par addition d'un volume de 1/10 de NP40 10 % [v/v] dans de l'eau) et lyser les cellules en utilisant 5 à 10 coups d'un homogénéiseur de Dounce. Cette étape permet la libération des antigènes viraux du cytosquelette qui sinon seraient retirés par centrifugation (étape vi).
- vi) Centrifuger les noyaux à 600 *g* pendant 10 min à 4 °C. Dans ces conditions, les noyaux ne sont pas lysés et il doit former un granulé blanc dense.
- vii) Enlever doucement le surnageant cytoplasmique dans un tube propre et ajouter de l'éthylène diamine tétra-acétique acide à 1,5 mM. Compléter jusqu'à 10 ml avec du TNE, aliquoter en petites quantités, congeler à –80 °C et irradier aux rayons gamma avec 6 kiloGreys. Stocker les aliquots à –80 °C.

Préparation du témoin, des cellules Vero non infectées

- viii) Produire des cellules Vero dans des flacons roulants avec du EMEM contenant 10 % de sérum fœtal de veau. Quand elles confluent, laver les monocouches une fois avec du PBS froid et racle les cellules de chaque flacons dans 5 à 10 ml de PBS glacé. Procéder comme décrit pour les cellules infectées dans les étapes iv à vii.

Préparation des sérums à tester

- ix) Dans une enceinte de sécurité biologique de classe II (avec un équipement de protection approprié) ou de classe III, diluer 5 fois le sérum à tester dans du PBS contenant 0,5 % (v/v) de Triton X-100 et 0,5 % (v/v) de Tween 20 dans les puits d'une plaque de microtitrage de 96 puits. Fermer hermétiquement la plaque. Le personnel du laboratoire doit porter un tablier et des gants et s'asperger les mains et la plaque fermée avec du Virkon 1 % avant d'enlever la plaque de microtitrage de l'enceinte de sécurité biologique pour ensuite la chauffer à 56 °C pendant 30 min.
- x) Mélanger 22,5 µl de sérum inactivé à la chaleur avec un volume égal de cellules Vero non-infectées avec l'antigène dilué à 1/100 dans du PBS. Mélanger complètement et incubé à 18-22° C pendant 30 min.
- xi) Ajouter 405 µl de solution bloquante (PBS contenant 5 % de sérum de poulet et 5 % de poudre de lait écrémé) pour donner une dilution finale de sérum de 1/100 et incubé entre 18 et 22 °C pendant 30 min. Des aliquots de 100 µl sont ajoutés aux 2 puits contenant des antigènes de NiV et aux 2 puits contenant des cellules Vero non infectées comme décrit en xiv.

Protocole pour l'ELISA

- xii) Diluer des cellules Vero témoin et les antigènes de NiV dans du PBS pour assurer que les puits témoins et d'antigènes viraux soient sensibilisés avec une concentration similaire de protéine. L'antigène est habituellement dilué à 1/1 000 jusqu'à 1/4 000, mais un facteur de dilution spécifique doit être déterminé pour chaque groupe d'antigène. Ajouter 50 µl de virus et de cellules témoins aux puits d'une plaque de microtitrage de 96 puits de Nunc Maxisorp comme suit : les antigènes viraux dans les colonnes 1, 3, 5, 7, 9 et 11 et les cellules témoin dans les colonnes 2, 4, 6, 8, 10 et 12 (Fig.1). Incuber à 37 °C pendant 1 h en secouant. Les plaques peuvent être ainsi incubées à 4° C durant la nuit.
- xiii) Laver les plaques d'ELISA 3 fois avec du PBS contenant 0,5 % de Tween 20 (PBST) (250 µl/ puits) et bloquer la réaction avec du PBS contenant 5 % de sérum de poulet et 5 % de poudre de lait écrémé (100 µl /puits) pendant 30 min à 37° C sur un agitateur.
- xiv) Laver les plaques 3 fois avec du PBST et ajouter 100 µl de sérum inactivé, obtenu à l'étape xi, à chaque puits comme indiqué dans le format ci-dessous. Ajouter 100 µl de PBS contenant 5 % de sérum de poulet et 5 % de poudre de lait écrémé aux puits contenant le conjugué ou le substrat témoin. Incuber les plaques sans secouer pendant 1 h à 37° C et laver 3 fois avec du PBST.
- xv) Diluer le conjugué protéine A-peroxydase G de raifort (Protein-A/G-Conjugate produit par Pierce, disponible chez Progen Biosciences, Produit No. 32490) dans du PBST contenant 1 % (w/v) de poudre de lait. Le facteur de dilution est d'approximativement 1/50 000. Bien mélanger et ajouter 100 µl de protéine A conjuguée à tous les puits excepté les puits contenant le substrat témoin. Incuber les plaques pendant 1 h à 37° C sans secouer et laver 4 fois avec du PBST.

- xvi) Préparer le substrat (3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine ; TMB ; Sigma, catalogue numéro T3405) en dissolvant une tablette (1 mg) dans 10 ml de tampon citrate phosphaté 0,05 M, pH 5,0, et ajouter 2 µl d'H₂O₂ 30 % (v/v) fraîche. Ajouter 100 µl du substrat TMB à chaque puits. Incuber pendant 10 min entre 18 et 22 °C et arrêter le test en ajoutant 100 µl d'acide sulfurique 1 M à chaque puits.
- xvii) Lire les plaques après avoir vérifié le puits témoin. Les densités optiques (DO) à 450 nm sur les antigènes de NiV et les antigènes de cellules Vero témoin sont utilisées pour calculer un rapport de densité optique pour chaque sérum (DO sur les antigènes de NiV/ DO sur les antigènes de cellules Vero témoin).

Interprétation des résultats

- xviii) Un rapport de DO > à 2,0 avec une DO pour l'antigène de NiV > à 0,20 est considéré comme positif.
- xix) Un rapport de DO > à 2,0 avec une DO pour l'antigène de NiV < à 0,20 est considéré comme négatif.
- xx) Les sérums donnant un rapport de DO entre 2,0 et 2,2 doivent être considéré comme douteux.
- xxi) Les sérums douteux et positifs doivent être testés par la SN.

Fig. 1. Plaque d'ELISA type et fiche de résultat.

	Ni	Ni	U	U	Ni	Ni	U	U	Ni	Ni	U	U
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sérum à tester n°1	Sérum à tester n°1	Sérum à tester n°1	Sérum à tester n°1								
B	Sérum à tester n°2	Sérum à tester n°2	Sérum à tester n°2	Sérum à tester n°2								
C	Sérum à tester n°3	Sérum à tester n°3	Sérum à tester n°3	Sérum à tester n°3								
D	Sérum à tester n°4	Sérum à tester n°4	Sérum à tester n°4	Sérum à tester n°4								
E	Sérum à tester n°5	Sérum à tester n°5	Sérum à tester n°5	Sérum à tester n°5					H+	H+	H+	H+
F	Sérum à tester n°6	Sérum à tester n°6	Sérum à tester n°6	Sérum à tester n°6					L+	L+	L+	L+
G	Sérum à tester n°7	Sérum à tester n°7	Sérum à tester n°7	Sérum à tester n°7					N-	N-	N-	N-
H	Sérum à tester n°8	Sérum à tester n°8	Sérum à tester n°8	Sérum à tester n°8					CC	TMB	CC	TMB

Plaque Nunc Maxisorp à 96 puits ; Ni : antigène du virus Nipah sur cellules ; U : cellules Vero non infectées (témoin) ; H+ : sérum témoin fortement positif (c-à-d sérums du porc 6 LAF) ; N : sérum témoin négatif (c-à-d sérum de porc négatif) ; L+ : sérum témoin faiblement négatif (c-à-d sérums du porc 6 LAF dilué à 1/800)

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'y a pas de vaccin disponible pour l'HeV et le NiV.

REMERCIEMENTS

Les épreuves décrites dans ce manuel ont été développées principalement au laboratoire australien de santé animale (*Australian Animal Health Laboratory*) et plus spécifiquement par Peter Hooper, Gail Russell and Megan Braun (immunohistochimie), Paul Selleck, Chris Morrissey, Brenda van der Heide, Greer Meehan and John White (ELISA) and Gary Crameri (test de plaques colorées immunologiquement).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. CHUA K., KOH C., CHENG S., HOOI P., KHONG J., WEE K., CHUA B., CHAN Y., LIM M. & LAM S. (2001). Surveillance of wildlife for source of Nipah virus: methodologies and outcomes. *In: Report on the Regional Seminar on Nipah virus infection, jointly organised by the Office International des Epizooties and the Department of Veterinary Services, Malaysia. Kuala Lumpur, Malaysia, 81–83.*
2. CHUA K.B., BELLINI W.J., ROTA P.A., HARCOURT B.H., TAMIN A., LAM S.K., KSIAZEK T.G., ROLLIN P.E., ZAKI S.R., SHIEH W.J., GOLDSMITH C.S., GUBLER D.J., ROEHRIG J.T., EATON B., GOULD A.R., OLSON J., FIELD H., DANIELS P., LING A.E., PETERS C.J., ANDERSON L.J. & MAHY B.W.J. (2000). Nipah virus: A recently emergent deadly paramyxovirus. *Science*, **288**, 1432–1435.
3. CRAMERI G., WANG L.-F., MORRISSEY C.W.J.R. & EATON B.T. (2002). A rapid immune plaque assay for the detection of Hendra and Nipah viruses and anti-virus antibodies. *J. Virol. Methods*, **99**, 41–51.
4. DANIELS P., AZIZ J., KSIAZEK T.G., ONG B.L., BUNNING M.J.B., FIELD H., OLSON J., HOFFMAN D., BOLOU J. & OZAWA Y. (2000). Nipah virus – developing a regional approach. *In: Comprehensive Reports on Technical Items presented to the International Committee or Regional Commissions. OIE, Paris, France, 2207–2217.*
5. DANIELS P., KSIAZEK T. & EATON B.T. (2001). Laboratory diagnosis of Nipah and Hendra virus infections. *Microbes Infect.*, **3**, 289–295.
6. FIELD H.E., BARRATT P.C., HUGHES R.J., SHIELD J. & SULLIVAN N.D. (2000). A fatal case of Hendra virus infection in a horse in north Queensland: clinical and epidemiological features. *Aust. Vet. J.*, **78**, 279–280.
7. HALPIN K., YOUNG P.L., FIELD H.E. & MACKENZIE J.S. (2000). Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J. Gen. Virol.*, **81**, 1927–1932.
8. HOOPER P., ZAKI S., DANIELS P. & MIDDLETON D. (2001). Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect.*, **3**, 315–322.
9. HOOPER P.T., GOULD A.R., RUSSELL G.M., KATTENBELT J.A. & MITCHELL G. (1996). The retrospective diagnosis of a second outbreak of equine morbillivirus infection. *Aust. Vet. J.*, **74**, 244–245.
10. HOOPER P.T., GOULD A.R., HYATT A.D., BRAUN M.A., KATTENBELT J.A., HENGSTBERGER S.G. & WESTBURY H.A. (2000). Identification and molecular characterization of Hendra virus in a horse in Queensland. *Aus. Vet. J.*, **78**, 281–282.
11. HYATT A.D., EATON B.T. & LUNT R. (1987). The grid-cell culture technique: the direct examination of virus-infected cells and progeny viruses. *J. Microsc.*, **145**, 97–106.
12. HYATT A.D., ZAKI S.R., GOLDSMITH C.S., WISE T.G. & HENGSTBERGER S.G. (2001). Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals. *Microbes Infect.*, **3**, 297–306.
13. INTERNATIONAL AIR TRANSPORT ASSOCIATION (2002). Dangerous Goods Regulations, 43rd edition. International Air Transport Association (IATA), 800 Place Victoria, P.O. Box 113, Montreal, Quebec H4Z 1M1, Canada.
14. JOHARA M.Y., FIELD H., RASHDI A.M., MORRISSEY C., VANDERHEIDE B., ROTA P., BINADZHAR A., WHITE J., DANIELS P., JAMALUDDIN A. & KSIAZEK T. (2001). Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 439–441.
15. MACKENZIE J.S., CHUA K.B., DANIELS P.W., EATON B.T., FIELD H.E., HALL R.A., HALPIN K., JOHANSEN C.A., KIRKLAND P.D., LAM S.K., MCMINN P., NISBET D.J., PARU R., PYKE A.T., RITCHIE S.A., SIBA P., SMITH D.W., VAN DEN HURK A.F., WANG L.F. & WILLIAMS D.T. (2001). Emerging viral diseases of South-east Asia and the western pacific. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 497–504.

16. MURRAY K., SELLECK P., HOOPER P., HYATT A., GOULD A., GLEESON L., WESTBURY H., HILEY L., SELVEY L. & RODWELL B. (1995). A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science*, **268**, 94–97.
17. NOR M.N.M., GAN C.H. & ONG B.L. (2000). Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **19**, 160–165.
18. ONG B.L., DANIELS P.W., BUNNING M., AZIZ J., WHITE J., MUNIANDY M., OLSON J., CHANG K.W., MORRISSY C., LIM Y.S., KSIAZEK T. & NORDIN M.N. (2000). A surveillance program for the detection of pig herds exposed to Nipah virus infections in peninsular Malaysia. In: Proceedings of the 9th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE). Abstract ID 63. Colorado, USA.
19. PATON N.I., LEO Y.S., ZAKI S.R., AUCHUS A.P., LEE K.E., LING A.E., CHEW S.K., ANG B., ROLLIN P.E., UMAPATHI T., SNG I., LEE C.C., LIM E. & KSIAZEK T.G. (1999). Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. *Lancet*, **354**, 1253–1256.
20. ROGERS R.J., DOUGLAS I.C., BALDOCK F.C., GLANVILLE R.J., SEPPANEN K.T., GLEESON L.J., SELLECK P.N. & DUNN K.J. (1996). Investigation of a second focus of equine morbillivirus infection in coastal Queensland. *Aust. Vet. J.*, **74**, 243–244.
21. US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION AND NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (1999). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Fourth Edition. Catalogue number 017-040-00547-4. United States Government Printing Office, Washington DC, USA.
22. WANG L.F., HARCOURT B.H., YU M., TAMIN A., ROTA P.A., BELLINI W.J. & EATON B.T. (2001). Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect.*, **3**, 279–287.
23. WANG L.F., MICHALSKI W.P., YU M., PRITCHARD L.I., CRAMER G., SHIELL B. & EATON B.T. (1998). A novel P/V/C gene in a new member of the Paramyxoviridae family, which causes lethal infection in humans, horses, and other animals. *J. Virol.*, **72**, 1482–1490.
24. WILLIAMSON M.M., HOOPER P.T., SELLECK P.W., GLEESON L.J., DANIELS P.W., WESTBURY H.A. & MURRAY P.K. (1998). Transmission studies of Hendra virus (equine morbillivirus) in fruit bats, horses and cats. *Aust. Vet. J.*, **76**, 813–818.
25. YOUNG P.L., HALPIN K., SELLECK P.W., FIELD H., GRAVEL J.L., KELLY M.A. & MACKENZIE J.S. (1996). Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. *Emerg. Infect. Dis.*, **2**, 239–240.

*

* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour les Maladies dues au virus Hendra et au virus Nipah (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).

LISTERIA MONOCYTOGENES

RÉSUMÉ

Une large variété d'espèces animales peut être infectée par L. monocytogenes, mais la listériose clinique est principalement une maladie des ruminants, avec des cas sporadiques occasionnels chez d'autres espèces. Les principales manifestations cliniques de la listériose animale sont une encéphalite, une septicémie et un avortement. La maladie est le plus souvent transmise par les fourrages stockés, provenant habituellement de l'ensilage. Les observations à l'autopsie et histopathologiques varient en fonction des signes cliniques.

La listériose est une des plus importantes maladies des hommes transmises par les aliments. Les manifestations cliniques de la maladie chez l'homme comprennent des signes de septicémie, méningite (ou méningo-encéphalite) et d'encéphalite, fréquemment précédés de symptômes pseudo-grippaux avec de la fièvre. Chez la femme enceinte, une infection intra-utérine ou cervicale peut entraîner un avortement spontané ou une mort fœtale tardive. Listeria monocytogenes a également été associée à des signes de gastro-entérite accompagnés de fièvre. Bien que la morbidité de la listériose soit relativement faible, la mortalité de la maladie encéphalitique systémique peut être très élevée avec des valeurs proches de 30 %. Les personnes âgées, les femmes enceintes, les nouveau-nés et les personnes immunodéprimées sont considérés comme ayant un risque élevé de contracter la maladie.

Un certain nombre de déterminants moléculaires et cellulaires de la virulence ont été identifiés pour cet agent pathogène intracellulaire. Bien qu'un polymorphisme au sein des souches de L. monocytogenes ait été mis en évidence pour certains déterminants de la virulence, cette hétérogénéité ne peut pas être corrélée au pouvoir du micro-organisme à déclencher la maladie. Par conséquent, toutes les souches de L. monocytogenes doivent être considérées comme potentiellement pathogènes.

Identification de l'agent pathogène : *il existe une variété de méthodes conventionnelles et rapides pour la détection et l'identification de L. monocytogenes dans les aliments et les prélèvements d'animaux malades. Les méthodes conventionnelles restent « la référence » pour la comparaison avec d'autres méthodes. Ces méthodes sont fréquemment très sensibles ; elles utilisent des agents sélectifs et des étapes d'enrichissement pour réduire la contamination par d'autres micro-organismes et permettre la multiplication de L. monocytogenes.*

Il existe différents niveaux de typage des souches de L. monocytogenes même si cela n'est pas imposé par la réglementation, ils comprennent le sérotypage, la lysotypie, le typage par électrophorèse des enzymes multilocus, le typage par électrophorèse des fragments obtenus après restriction enzymatique de l'ADN (de type conventionnel et par électrophorèse en champ pulsé), le typage basé sur le séquençage d'acides nucléiques et le typage par amplification au hasard de séquences d'ADN.

Épreuves sérologiques : *les épreuves sérologiques pour la détection des anticorps spécifiques ne sont habituellement pas utilisées pour le diagnostic de la listériose. Un certain nombre de formats ont été testés et tous ont été trouvés largement non fiables, manquant de sensibilité et de spécificité. Des épreuves sérologiques expérimentales basées sur la détection de l'anti-listériolysine O ont été utilisées dans certaines investigations épidémiologiques et comme support pour le diagnostic d'infection du système nerveux central lorsque la culture est négative. La détection des antigènes de L. monocytogenes par des méthodes immunohistochimiques est utilisée pour le diagnostic de la forme encéphalitique de la maladie.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : de grandes difficultés ont été rencontrées pour le développement d'un vaccin contre *L. monocytogenes*, car il s'agit d'un micro-organisme intracellulaire nécessitant l'activation des cellules T lors de la réponse immunitaire. Des vaccins expérimentaux conférant une protection contre l'infection à *L. monocytogenes*, ont été testés sur des animaux de laboratoire selon différentes stratégies telles que l'immunisation avec un plasmide ADN, l'association de molécules CD40 et de *L. monocytogenes* inactivés par la chaleur, l'inoculation de mutants déficients en listériolysine avec la listériolysine encapsulée dans un liposome et enfin l'immunisation avec un antigène de *Listeria* associé à la molécule IL-12.

A. INTRODUCTION

Une large variété d'espèces animales peut être infectée par *Listeria monocytogenes* comprenant les mammifères, les oiseaux, les poissons et les crustacés, bien que l'infection clinique ne se manifeste que chez les ruminants ; les porcs développent rarement la maladie et les oiseaux sont généralement des porteurs subcliniques du micro-organisme. La plupart des infections chez l'animal sont subcliniques, mais la listériose peut survenir soit de façon sporadique soit sous forme épizootique. En plus de l'impact économique de la listériose chez l'animal, il y existe un lien entre l'animal et son rôle en tant que source d'infection pour l'homme, essentiellement lors de consommation de produits animaux contaminés. L'infection peut aussi être contractée par contact direct avec des animaux infectés, particulièrement lors des vêlages et des agnelages (68) ; cependant ces infections sont très rares. L'importance relative de la transmission zoonotique de la maladie chez l'homme n'est pas claire. La contamination de l'environnement de production des aliments constitue apparemment plus un problème de santé publique (52).

Chez l'animal, les manifestations cliniques de la listériose comprennent une encéphalite, une septicémie et de l'avortement, particulièrement chez les moutons, les chèvres et les bovins. La forme septicémique est relativement peu fréquente et survient généralement mais de façon non variable chez le nouveau-né. Elle est marquée par une perte de l'appétit, de la fièvre et la mort. La forme encéphalitique est parfois nommée la « circling disease » du fait d'une tendance à tourner dans la même direction. Il s'agit de la manifestation la plus fréquente de la maladie chez les ruminants. Les signes comprennent une dépression, une anorexie, un port anormal de la tête ou le fait de tourner la tête d'un seul côté et une paralysie faciale unilatérale. L'avortement en fin de terme est fréquent (après 7 mois chez les bovins et 12 semaines chez les ovins) (34, 67). Une seule forme clinique de la listériose survient habituellement chez un groupe particulier d'animaux. Une ophtalmie a également été décrite chez les bovins et les moutons (66). Plus rarement, des mammites ont été associées à l'infection à *L. monocytogenes* chez les ruminants, et des infections gastro-intestinales peuvent survenir à l'occasion chez les moutons (21). Quand la listériose se manifeste chez le porc, les premiers symptômes incluent une septicémie, avec une encéphalite moins fréquemment identifiée et, rarement un avortement. Bien que les oiseaux soient habituellement porteurs sains, des cas sporadiques de listériose ont été rapportés, le plus souvent accompagnés de septicémie et, un peu moins habituellement, d'une méningo-encéphalite. La listériose aviaire peut être la conséquence d'une infection secondaire suite à une infection virale ou salmonellique (68).

Les recherches *post mortem* et histopathologiques de la listériose animale dépendent des formes cliniques. Pour la forme encéphalitique, le liquide céphalorachidien peut être trouble et les vaisseaux méningés congestionnés. Des lésions pathologiques prononcées du cerveau sont rares. Parfois, la medulla montre des zones de ramollissement. Quoiqu'il en soit, l'histopathologie est caractéristique de la maladie avec des amas de cellules inflammatoires accompagnés au niveau périvasculaire adjacent de tas de cellules plasmatiques (essentiellement des lymphocytes et des histiocytes) et de manière occasionnelle de neutrophiles. Les micro-abcès touchent souvent plus gravement le cerveau de manière unilatérale. Des zones de ramollissements plus étendues peuvent être observées. La substance médullaire et la protubérance annulaire sont le plus souvent touchées. Dans la forme septicémique, on peut observer de multiples foyers de nécrose dans le foie et, moins fréquemment dans la rate. Les avortons des ruminants présentent très peu de lésions macroscopiques, toutefois, une autolyse peut avoir eu lieu si le fœtus n'a pas été expulsé tout de suite (48, 67).

La listériose animale apparaît de façon prédominante comme une maladie transmise par les fourrages stockés, l'environnement étant la principale source de contamination. L'ensilage est la cause principale de listériose transmise par l'alimentation animale (28, 69). La muqueuse intestinale est la principale voie d'entrée après ingestion orale, dans le cas des listérioses septicémique/abortive. Le temps d'incubation peut être court, comme un jour par exemple. La période d'incubation pour la forme encéphalitique est habituellement de 2 à 3 semaines, et la durée de la maladie chez les moutons et les chèvres est habituellement courte (1 à 4 jours) (52), mais elle peut être plus longue chez les bovins.

Bien que *Listeria monocytogenes* soit connu comme agent pathogène chez l'animal depuis de nombreuses années, son rôle en tant qu'agent pathogène transmis par les aliments et affectant l'homme n'a été reconnu

seulement que dans les années 1980, quand des investigations documentées d'épidémies de listériose associées à la contamination d'aliments commencèrent à apparaître dans la littérature (57). Actuellement, *L. monocytogenes* est considéré comme l'un des agents pathogènes les plus importants responsables d'infection transmises par les aliments. Les explications possibles de l'émergence de la listériose humaine transmise par les aliments comme un des problème majeurs de santé publique seraient les changements importants dans la production, les processus de fabrication et la distribution en agro-alimentaire, l'utilisation fréquente de la réfrigération comme première étape de conservation des aliments, les modifications dans les habitudes de consommation de la population, particulièrement orientée vers les produits pratiques et prêts à être consommés, ainsi que l'augmentation du nombre de personnes considérées comme étant à haut risque pour développer la maladie (personnes âgées, femmes enceintes, nouveau-nés, immunodéprimés) (53, 63).

Les premiers signes d'une listériose humaine peuvent comprendre des signes de septicémie, de méningite (ou méningo-encéphalite) et d'encéphalite, fréquemment précédés de symptômes pseudo-grippaux avec de la fièvre. Des manifestations de gastro-entérite avec de la fièvre peuvent aussi survenir. Bien que la morbidité de la listériose soit relativement faible, la mortalité peut être de l'ordre de 30 %. Chez la femme enceinte, l'infection peut se traduire par une fausse couche, une mort tardive du fœtus ou un accouchement prématuré (53, 61).

Listeria monocytogenes est une bactérie Gram positif. Elle est responsable de la plupart des infections chez l'homme, bien que de rares cas d'infections dues à *L. ivanovii* and *L. seeligeri* aient été décrits. Chez l'animal, *L. monocytogenes* est responsable de la majorité des infections, mais des d'infections dues à *L. ivanovii* et *L. innocua* ont été signalées. *Listeria ivanovii* a été associée à des avortements et à quelques rares cas de méningo-encéphalites chez les moutons.

Ainsi, bien que *L. monocytogenes* ait clairement un potentiel zoonotique, elle est également un contaminant important de l'environnement ayant un impact sur la santé publique.

Il existe une grande variété de méthodes permettant le typage des souches de *L. monocytogenes* lors des investigations épidémiologiques, mais la question fondamentale, qui est de savoir si toutes les souches sont capables de causer la maladie, reste sans réponse (31, 42, 45, 46).

Plusieurs déterminants moléculaires de la virulence ont été identifiés comme jouant un rôle dans l'infection cellulaire par *L. monocytogenes* et la recherche des mécanismes d'action constitue l'un des modèles les plus excitants d'interaction agent pathogène/hôte au niveau cellulaire et moléculaire. Ces déterminants de la virulence comprennent entre autres, des internalines, la listériolysine O (LLO), la protéine ActA, deux phospholipases, une métalloprotéase, une protéine Vip, un système d'exclusion de la bile (BilE) et une hydrolase des sels biliaires (17, 22, 25, 29, 60). Bien qu'il existe un polymorphisme au sein des différentes souches pour certains de ces déterminants de virulence, il n'y a pas de corrélation avec la possibilité ou non de l'organisme à déclencher la maladie (42).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Il existe une grande variété de méthodes conventionnelles et rapides actuellement disponibles pour la détection et l'identification de *L. monocytogenes* dans les aliments et à partir des prélèvements d'animaux malades. Les méthodes bactériologiques conventionnelles sont importantes pour différentes raisons : elles permettent l'isolement de l'organisme en culture pure, ce qui est nécessaire en terme de réglementation. Elles restent la méthode de référence vis-à-vis des autres méthodes qui sont comparées et validées par rapport à celles-ci. Ces méthodes sont fréquemment très sensibles et ne nécessitent pas de matériel sophistiqué et coûteux. Certains inconvénients de ces types de méthodes sont : des temps d'incubation relativement longs nécessaires à la réalisation du protocole, plusieurs manipulations, la nécessité de posséder de nombreux produits chimiques, réactifs et milieux différents, la contamination et la prolifération d'autres micro-organismes masquant la présence de la bactérie, la possibilité de laisser passer des variants atypiques présents dans l'organisme étudié et la relative subjectivité nécessaire lorsque l'on doit interpréter la croissance bactérienne sur des boîtes de gélose sélective et différentielle (1).

L'isolement et l'identification de *L. monocytogenes* dans les aliments, l'environnement ou les prélèvements vétérinaires nécessitent l'utilisation d'agents sélectifs et de procédures d'enrichissement de façon à limiter les micro-organismes contaminants à un niveau raisonnable et à permettre ainsi la multiplication de *L. monocytogenes* à un niveau suffisant pour assurer la détection de l'organisme. Dans les premiers temps de la bactériologie clinique de la listériose, un enrichissement à froid (32) était habituellement réalisé à cette fin, exploitant la capacité de l'organisme à se multiplier aux températures de réfrigération alors que les bactéries de contamination ne peuvent pas se multiplier dans ces conditions. Cependant, cette procédure nécessite des temps d'incubation très longs, souvent des mois ce qui est inacceptable pour les investigations actuelles lors

d'épizooties d'origine alimentaire ou de cas sporadiques. Il en est de même pour la mise en place des programmes d'analyse des dangers et d'identification des points critiques en production agro-alimentaire et dans les sites de transformation. Un nombre de composants sélectifs permettant la croissance de *L. monocytogenes* à des températures normales d'incubation ont été ajoutés aux milieux de culture, permettant de raccourcir ainsi le délai nécessaire à la croissance sélective de l'organisme. Ces composants sélectifs sont par exemple : cycloheximide, colistine, cefotetan, fosfomycine, lithium chloride, acide nalidixique, acriflavine, phényléthanol, céftazidime, polymyxine B et moxalactam (3, 4, 8, 35, 39, 65).

Le diagnostic bactériologique de la listériose animale comprend traditionnellement l'isolement direct à partir d'un prélèvement sur une gélose au sang ou un autre milieu enrichi et en parallèle la technique de l'enrichissement à froid, avec des sous-cultures hebdomadaires pendant 12 semaines (32, 51, 67). La détection des antigènes de *L. monocytogenes* par des méthodes immunohistochimiques sur des coupes de tissus fixées au formol s'est révélée plus sensible dans le diagnostic de la forme encéphalitique chez les ruminants que l'ensemencement direct et l'enrichissement à froid des cultures bactériennes (20, 44). L'introduction de procédures alternatives d'enrichissement et d'agents sélectifs pour l'isolement de *L. monocytogenes* à partir des aliments et de l'environnement a ouvert la possibilité d'utiliser ces techniques pour l'analyse bactériologique des échantillons provenant d'animaux malades.

En dépit des progrès réalisés dans l'isolement sélectif *L. monocytogenes* des aliments, il existe encore de la place pour l'amélioration dans de nombreux domaines. Aucune procédure ne peut être créditée comme étant suffisamment sensible pour détecter *L. monocytogenes* dans tous les types d'aliments (23). De plus, des cellules de *L. monocytogenes* stressées et moribondes peuvent être trouvées grâce au processus de réfrigération, chauffage, acidification et à d'autres types de traitement chimique ou physique. Ces bactéries stressées nécessitent des conditions de culture particulières de revivification avant de pouvoir être détectées en culture.

a) Méthodes d'isolement

Des méthodes conventionnelles d'isolement *L. monocytogenes* à partir des aliments ont été reconnues dans le cadre de la réglementation internationale incluant la méthode américaine de la *Food and Drug Administration* (FDA) (35), la méthode officielle de l'Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (8), la norme ISO 11290 (39 à 41), la méthode du département de l'agriculture des États-Unis d'Amérique (USDA) - Services d'inspection et de sécurité alimentaire (65) et les méthodes de référence françaises (3, 4).

En fonction de la nature de l'échantillon, une méthode particulière peut être plus appropriée qu'une autre. Le « *International Organization for Standardization Technical Committee ISO/TC 34, Agricultural Food Products, Subcommittee SC 9, Microbiology* », a annoncé que la norme ISO 11290, parties 1 et 2 (39 à 41), peut être utilisée pour la détection de *L. monocytogenes* dans une large variété de produits alimentaires et de produits d'alimentation animale. Bien que ce comité reconnaisse que cette norme puisse ne pas être appropriée dans certains cas, il recommande que des efforts soient faits pour appliquer cette méthode horizontale chaque fois que cela est possible.

Les méthodes FDA et AOAC peuvent être utilisées pour les laits et les produits laitiers. La méthode USDA-FSIS est recommandée pour les viandes rouges et la volaille (produit cru ou cuit prêt à être consommé), les œufs et les ovoproduits ainsi que les échantillons d'environnement.

La procédure traditionnelle d'isolement de *L. monocytogenes* des tissus animaux a été l'étalement direct des prélèvements sur une gélose au sang de mouton ou un autre milieu de culture riche et l'utilisation concomitante de la technique d'enrichissement à froid, avec des sous-cultures hebdomadaires jusqu'à 12 semaines (32, 51, 67). L'isolement de l'organisme par étalement direct est relativement facile si le nombre de bactérie est important dans un organe habituellement stérile, comme c'est le cas dans la forme septicémique de la maladie. Mais l'isolement est difficile lorsque l'organisme est présent en faible nombre, comme dans le cas de la forme encéphalitique ou quand les prélèvements sont fortement contaminés. Une comparaison entre les performances de l'étalement direct, de l'enrichissement à froid et de la méthode AOAC, a clairement montré la supériorité de cette dernière par rapport aux deux autres pour l'isolement de *L. monocytogenes* dans des prélèvements variés d'animaux *post mortem*, à la fois en terme de temps nécessaire à l'isolement et à l'identification de l'organisme qu'en terme des taux d'isolement (26).

Pour le dénombrement de *L. monocytogenes*, la méthode de référence de la norme ISO 11290, partie 2 (40) est appliquée ainsi que le protocole optionnel mentionné dans les méthodes FDA et USDA-FSIS (35, 65).

Dans le cas de listériose animale, les échantillons seront choisis en fonction des signes cliniques de la maladie : prélèvements des lésions dans le foie, les reins et/ou la rate, dans le cas de forme septicémique ; dans le liquide rachidien, la protubérance annulaire et la substance médullaire dans le cas de la forme encéphalitique ; et le placenta (cotylédons), le contenu fœtal abdominal et/ou les sécrétions utérines dans le cas d'avortement. Les températures de réfrigération (4 °C) doivent être maintenues pour la conservation et

l'acheminement des prélèvements. Si l'échantillon est déjà congelé, il doit être gardé congelé jusqu'à l'analyse.

Le protocole recommandé pour l'isolement de *L. monocytogenes* à partir de prélèvements d'autopsie est décrit ci-dessous tel qu'il a été publié initialement (26). Il serait possible de l'améliorer en y incluant les mises à jour récentes de la méthode de l'AOAC et les nouveaux développements dans l'identification et la confirmation des isolats de *Listeria*, mais aucune publication n'existe jusqu'à présent sur ce sujet.

- *Protocole d'isolement à partir de prélèvements d'autopsie*

- i) Inoculer 10–25 g ou ml d'échantillon (selon la quantité disponible) dans 225 ml de bouillon d'enrichissement pour *Listeria*. Lors de listériose animale il arrive que la taille des échantillons soit réduite, parfois inférieure à la quantité recommandée pour les échantillons d'aliment (soit 25 g ou ml). Dans ce cas, la quantité d'échantillon la plus grande possible (en visant 10 à 25 g ou ml) doit être inoculée (26). (Bouillon d'enrichissement base pour *Listeria* : bouillon tryptone-soja Oxoid, 30 g ; extrait de levure Difco yeast, 6 g ; eau, 1 litre ; agents de sélection : acriflavine, 2,3 mg ; acide nalidixique, 9,2 mg ; cycloheximide, 11,5 mg ; ajouter les agents de sélection à 225 ml de bouillon de base).
- ii) Incuber à 30 °C pendant 48 h.
- iii) Étaler 0,1 ml du milieu d'enrichissement sur des boîtes de gélose Oxford.
- iv) Incuber les boîtes à 37 °C. Examiner la culture bactérienne après 24 et 48 h.
- v) Tester 5 colonies (ou toutes les colonies, si il y en a moins) ayant une apparence typique de colonies de *L. monocytogenes* : vérifier la forme des bactéries, la coloration de Gram, l'activité hémolytique sur une gélose au sang (sang de cheval défibriné), la mobilité à 20 °C, la fermentation du glucose (+), du rhamnose (+) et du xylose (+), l'hydrolyse de l'esculine et la production de la catalase.

Tous les milieux de culture préparés seront soumis à un contrôle-qualité et doivent permettre la croissance de l'organisme recherché à partir d'un inoculum faible. La souche de référence doit être cultivée en parallèle des échantillons suspectés de façon à s'assurer que les tests fonctionnent correctement.

Les échantillons destinés à l'analyse doivent être représentatifs de l'aliment, incluant la surface externe et l'intérieur. Les méthodes conventionnelles de culture comprennent une procédure d'enrichissement basée sur l'utilisation de milieu de culture liquide contenant des agents sélectifs. La nature des milieux et des agents sélectifs varie selon la méthode. La méthode FDA (35) et la méthode ISO utilisent toutes les deux une étape de pré-enrichissement qui permet la revivification des cellules de *L. monocytogenes* stressées, alors que dans la méthode USDA-FSIS (65) et la méthode AOAC (8), les échantillons sont directement traités dans le bouillon d'enrichissement. Dans le cas de la méthode FDA, le pré-enrichissement s'effectue à 30 °C pendant 4 h en bouillon trypticase-soja contenant de l'extrait de levure sans agents sélectifs. Le protocole ISO utilise un « enrichissement primaire » pendant 24 h à 30 °C en présence d'agents sélectifs, mais en demi-concentration (« bouillon Fraser-demi »).

Les échantillons sont enrichis pendant 24 à 72 h à 30 °C, 35 °C ou 37 °C, selon la méthode. La méthode FDA utilise du TSB YE contenant de l'acriflavine, de l'acide nalidixique et du cycloheximide. La méthode USDA-FSIS utilise 2 étapes d'enrichissement : l'enrichissement primaire est fait dans le milieu de l'Université de Vermont (UVM), contenant de l'acide nalidixique et de l'acriflavine ; l'enrichissement secondaire est effectué en bouillon Fraser, contenant de l'acide nalidixique, du chlorure de lithium et de l'acriflavine. La norme ISO propose le bouillon Fraser pour le second enrichissement, contenant les agents sélectifs en concentration entière alors que l'enrichissement primaire est effectué en bouillon Fraser-demi, comme cela a été dit précédemment. La méthode AOAC demande un enrichissement sélectif en bouillon trypticase soja contenant de l'acriflavine, de l'acide nalidixique et du cycloheximide (« milieu d'enrichissement sélectif »).

Après un enrichissement sélectif, les cultures sont ensuite isolées sur différentes géloses sélectives/différentielles pour l'isolement de colonies présumées de *L. monocytogenes*. Toutes les méthodes, sauf celle de la norme ISO, utilisent la gélose Oxford ou une variante, la gélose MOX (USDA-FSIS). La gélose Oxford renferme du chlorure de lithium, du cycloheximide, de la colistine, de l'acriflavine, du cefotaxime et de la fosfomycine comme agents sélectifs, et les colonies typiques de *Listeria* sont petites, noires et entourées d'un halo noir. En plus de la gélose Oxford, la FDA utilise du chlorure/phényléthanol/moxalactam de lithium (LPM) ou gélose PALCAM qui renferme du chlorure de lithium, de la polymyxine B, de l'acriflavine et du ceftazidime. La gélose MOX utilisée dans la méthode USDA-FSIS contient du chlorure de lithium, de la colistine et du moxalactam. Les deux milieux sélectifs utilisés pour l'isolement dans la méthode de la norme ISO sont des géloses *Listeria* selon Ottaviani et Agosti (ALOA) qui contiennent du chlorure de lithium, de l'acide nalidixique, de la ceftazidime, de la polymyxine B et de l'amphotéricine B (ou cycloheximide), et tout autre milieu sélectif (au choix du laboratoire) tel que Oxford ou PALCALM. Sur gélose ALOA, les colonies de *L. monocytogenes* ont un aspect typique : colonie vert-bleutée, entourées d'un halo opaque (41).

Les laboratoires Bio-Rad ont mis au point le RAPID[®]L.Mono, un milieu sélectif chromogène pour la détection directe et la numération de *L. monocytogenes*, qui est basé sur l'isolement direct, la détection de la phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol (PI-PLC) par apparition d'une coloration et l'utilisation du xylose. *L. monocytogenes* donne naissance à des colonies bleues (PI-PLC positives) sans halo jaune (xylose négatives) ; *L. ivanovii* produit des colonies bleu-vert (PI-PLC positives) avec un halo jaune (xylose positives). Les colonies des autres *Listeria* spp. sont blanches (PI-PLC négatives).

b) Méthodes conventionnelles d'identification

Les colonies typiques de *Listeria* spp. sur les géloses sélectives/différentielles citées sont ensuite sélectionnées pour une identification de *L. monocytogenes*. Le test de Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP test) est un outil très utile pour aider à identifier l'espèce de *Listeria* spp à laquelle appartient l'isolat. Il est utilisé dans les protocoles de l'ISO et de l'AOAC et il est considéré comme optionnel dans les méthodes FDA et USDA-FSIS. Le test est simple à réaliser et facile à lire. Il consiste à réaliser un ensemencement de souches de *Staphylococcus aureus* β -hémolytique (souche ATCC 49444 ou 25923, souche NCTC 7428 ou 1803) et *Rhodococcus equi* (souche ATCC 6939, souche NCTC 1621) en un seul trait en traçant des lignes parallèles, sur une gélose au sang de mouton ou une gélose double couche avec une très fine couche de gélose au sang. Les ensemencements doivent être suffisamment séparés pour permettre la lecture des souches à tester et des souches témoins qui seront ensemencées perpendiculairement entre les deux organismes indicateurs, sans qu'elles se touchent (séparées de 1 à 2 mm). Après une incubation de 24 à 48 h à 35 à 37 °C (12 à 18 h si la couche mince de gélose au sang est utilisée), une réaction positive est visible par une zone de β -hémolyse à l'intersection entre les souches testées et la souche indicatrice. *L. monocytogenes* est positif avec la ligne de *S. aureus* et négatif avec la ligne de *R. equi*, tandis que pour *L. ivanovii* les résultats sont inversés (51).

Tableau 1. Différenciation des espèces de *Listeria*

Espèces	Hémolyses	Production d'acide		Test CAMP	
		Rhamnose	Xylose	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	–	+	–
<i>L. innocua</i>	–	V	–	–	–
<i>L. ivanovii</i>	+	–	+	–	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	–	+	(+)	–
<i>L. welshimeri</i>	–	V	+	–	–
<i>L. grayi</i> subsp. <i>Grayi</i>	–	–	–	–	–
<i>L. grayi</i> subsp. <i>Murrayi</i>	–	V	–	–	–

V : variable; (+) : réaction faible ; + : > 90 % réactions positives ; – : pas de réaction.

La sérologie, le typage lysogénique et l'essai de pathogénicité sur la souris immunodéprimée sont considérés comme des tests optionnels de ces méthodes.

c) Méthodes d'identification rapides

Les protocoles décrits ci-dessous comprennent des tests conventionnels ou non qui sont disponibles dans le commerce, tels que Vitek, API, MICRO-ID, les kits utilisant une méthode immuno-enzymatique (ELISA) et les kits de recherche de l'acide nucléique, qui peuvent aider pour l'identification de *L. monocytogenes*. La réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ciblant le gène *hly* s'est révélée sensible et rapide pour confirmer l'identité d'une souche isolée sur géloses sélectives/différentielles, et donc suspecte d'être *L. monocytogenes* (30). En plus du test RAPID[®]L.Mono et des géloses ALOA (décrits ci-dessus), d'autres milieux chromogènes ont été développés pour différencier les colonies de *L. monocytogenes* des colonies des autres *Listeria* : gélose chromogène pour *Listeria* d'Oxoid (OCLA) et CHROMagar *Listeria* mise au point par CHROMagar Microbiology.

i) MICRO-ID *Listeria*

MICRO-ID *Listeria* est un système disponible sur le marché (Organon Teknika Corp., 100 Akzo Ave., Durham, NC 27712, USA) qui a été validé par l'AOAC (méthode 992.18) (5) pour l'identification présomptive de l'espèce *Listeria* à partir d'aliment ou d'échantillons d'environnement. Il permet une alternative aux tests conventionnels biochimiques des isolats de *Listeria* spp. selon les méthodes FDA et USDA-FSIS. Il est basé sur le fait que l'inoculum testé renferme des enzymes qui peuvent être détectées après 24 h à 37 °C. La différenciation de l'espèce *Listeria* est basée sur un code octal obtenu après addition des valeurs

numériques pour chaque groupe de 3 tests et sur les réactions obtenues par le CAMP test et les caractéristiques d'hémolyse qui sont réalisées séparément.

ii) *Le système Vitek Automicrobic*

Le système Vitek Automicrobic (bioMérieux Vitek, Inc., 595 Anglum Dr., Hazelwood, MO, USA) est un système automatique d'identification microbiologique qui peut être utilisé pour l'identification présomptive des espèces de *Listeria* transmises par les aliments et pour le dépistage des isolats non-*Listeria*. Il a été validé par l'AOAC comme méthode 992.19 (6). Le système utilise une chambre d'incubation avec un lecteur optique, une unité de préparation pour l'inoculation du test et un micro-ordinateur. Des cartes d'identification des bactéries Gram-positives (GPI) et des bactéries Gram-négatives (GNI+) contiennent chacun 30 tests biochimiques. Les modifications sont analysées par le micro-ordinateur qui identifie l'organisme testé au niveau du genre et/ou de l'espèce. L'identification des espèces *Listeria* nécessite l'utilisation d'une carte GPI et de deux réactions sur la carte GNI+. Néanmoins, pour l'identification de certaines *Listeria*, l'analyste doit réaliser le CAMP test, l'hémolyse et/ou les tests de réduction des nitrates comme cela est décrit dans la méthode FDA.

Les organismes placés dans la catégorie « LM » sont identifiés comme *L. monocytogenes* ou *L. innocua* ; dans la catégorie « LI », comme *L. ivanovii* ou *L. seeligeri* ; dans la catégorie « LW », comme *L. welshimeri* ; et dans la catégorie « LG », comme *L. grayi* or *L. murrayi* (une sous-espèce de *L. grayi*). Les organismes dans la catégorie « O » sont classés comme des espèces non-*Listeria*. D'autres tests doivent être réalisés pour identifier l'espèce au sein de chaque catégorie selon la méthode FDA.

D'autres méthodes commercialement disponibles pour l'identification des espèces *Listeria* comprennent la galerie API LISTERIA (bioMérieux), le MICROBACT 12L (Microgen), le système MicroLog (Biolog), le système d'identification microbiologique Sherlock Microbial Identification System (MIS) (Microbial ID ; basé sur les profils d'acides gras) et le système Walk/Away (MicroScan).

iii) *Méthodes rapides de détection immunologiques*

Un certain nombre de méthodes immunologiques ont été développées pour identifier *L. monocytogenes* dans les aliments et les méthodes suivantes disponibles commercialement ont été validées par un ou plusieurs systèmes de validation reconnus (24, 58).

- **Méthode colorimétrique immuno-enzymatique utilisant un anticorps monoclonal (*Listeria*-Tek)**

Le *Listeria*-Tek est une méthode officielle de l'AOAC 994.03 (9) et elle est mise en œuvre pour la détection de *Listeria* spp. dans les produits laitiers, les produits de la mer et les viandes. Du fait que l'anticorps monoclonal (AcM) peut donner des réactions croisées avec les autres *Listeria* spp., le test n'est pas un test de confirmation de *L. monocytogenes*.

Le kit de diagnostic est disponible commercialement chez Organon Teknika Corp., 100 Akzo Ave, Durham, NC 27704, USA.

Les cultures enrichies trouvées positives par cette méthode doivent être isolées sur des milieux sélectifs et les colonies suspectes sont confirmées biochimiquement pour l'identification de *L. monocytogenes* selon la méthode FDA. Un résultat positif est seulement validé si les témoins positifs et négatifs ont donné des valeurs d'absorbance correctes.

- **Méthode de dépistage colorimétrique immuno-enzymatique utilisant un anticorps polyclonal (TECRA® *Listeria* Visual Immunoassay [TLVIA])**

Le TLVIA est une méthode officielle de l'AOAC 995.22 (10) et elle est mise en œuvre pour la détection de *Listeria* spp. dans les produits laitiers, les produits de la mer et les viandes (sauf la viande hachée crue) et les légumes à feuilles. Une version optimisée, comprenant des protocoles d'enrichissement pour des aliments supplémentaires mais omettant l'antifongique cycloheximide (car toxique), est la méthode officielle 2002.09 de l'AOAC (14) : il s'agit d'une procédure de dépistage pour la détection de *Listeria* spp. dans les viandes crues, les légumes frais, les viandes transformées, les fruits de mer, les aliments à base de lait, les fruits et les jus de fruits.

Le kit de diagnostic est disponible commercialement chez TECRA International Pty Ltd, P.O. Box 788, Willoughby, NSW, Australie.

Les cultures enrichies trouvées positives par cette méthode doivent être isolées sur des milieux sélectifs et les colonies suspectes identifiées selon les critères spécifiés dans les méthodes de la FDA et de l'USDA.

- **Méthode immuno-enzymatique Assurance[®] utilisant un anticorps polyclonal**

La méthode immuno-enzymatique Assurance[®] *Listeria* est une méthode officielle de l'AOAC 996.14 (11) et elle peut être utilisée pour la détection de *Listeria* spp., incluant *L. monocytogenes*, dans les produits laitiers, les viandes rouges, le porc, les produits de volaille, les fruits, les fruits à coques, les produits de la mer, les pâtes, les légumes, les fromages, les farines animales, le chocolat, les œufs et l'environnement (surfaces environnantes).

Les lectures au dessus de la valeur seuil sont considérées comme des résultats positifs présomptifs et les cultures enrichies doivent ensuite être confirmées par les procédures d'isolement et d'identification décrites dans la méthode FDA.

Le kit de diagnostic est disponible commercialement chez BioControl Systems, Inc., 12822 SE 32nd St., Bellevue, WA 98005, USA.

- **Test Visual Immunoprecipitate (VIPTM)**

Le test VIPTM est une méthode officielle de l'AOAC 997.03 (12). Il peut être utilisé pour la détection de *L. monocytogenes* et des autres *Listeria* spp. dans les produits laitiers, les viandes rouges, le porc, la volaille et les produits dérivés, les produits de la mer, les fruits, les légumes, les pâtes, le chocolat, les œufs, les farines animales, et l'environnement (surfaces environnantes).

Les tests positifs présomptifs doivent être confirmés par les procédures d'isolement et d'identification décrites par la méthode FDA.

Les unités VIP sont disponibles commercialement chez BioControl Systems, Inc., 12822 SE 32nd St., Bellevue, WA 98005, USA.

- **Méthode de tri VIDAS LIS**

Cette méthode immuno-enzymatique (ELFA) est une méthode officielle de l'AOAC 999.06 (13). Elle a été validée par l'association française de normalisation (AFNOR) et selon le schéma de l'*European Microbiological Methods Assessment Scheme* (EMMAS) (15). Elle est utilisée pour le dépistage des antigènes *Listeria* spp. dans des produits laitiers, des légumes, des produits de la mer, des viandes crues et dans la volaille ainsi que pour les viandes et les volailles en cours de transformation.

Cette méthode immunologique est réalisée avec l'appareil automatisé VIDAS[®]. L'ordinateur compare les valeurs à des références et un rapport d'analyse positif ou négatif est produit. Les résultats positifs doivent être confirmés par la méthode bactériologique de référence selon la méthode FDA. Une amélioration de ce protocole utilisant les bouillons de Fraser et Fraser en vue de l'enrichissement (méthode officielle 2004.06 de l'AOAC) a été évaluée dans une étude inter-laboratoires et aucune différence significative n'a été observée dans ses performances par rapport à la méthode officielle 999.06 de l'AOAC (59).

La méthode VIDAS *Listeria monocytogenes* 2 (LMO 2) comprend des AcMs spécifiques pour capturer les antigènes de *L. monocytogenes* ; elle a été validée par l'AFNOR, y compris pour son utilisation avec des échantillons à partir de l'environnement.

Le système VIDAS est disponible chez bioMérieux, Inc., 595 Anglum Rd., Hazelwood, MO 63042, USA.

D'autres méthodes immunologiques validées selon des systèmes officiels sont disponibles, elles comprennent le VIDAS *Listeria* Species Xpress (bioMérieux), validé par l'AFNOR ; le Transia Plate *Listeria* ELISA (Transia, Diffchamb Ltd), validé par l'AFNOR ; le système ELISA automatisé EIAFOSS *Listeria* (Foss Electric), validé par l'AOAC Research Institute ; la méthode immunochromatographique REVEAL for *Listeria* (Neogen Corporation), validée par l'AOAC Research Institute ; la méthode immunochromatographique Clearview *Listeria* Rapid Test (Oxoid), validée par l'AFNOR, EMMAS et l'AOAC Research Institute et le système Listertest (Vicam), d'immunoséparation magnétique validé par l'AOAC Research Institute (15).

D'autres méthodes disponibles basées sur l'immunologie, comprennent le test ELISA Transia Plate *Listeria monocytogenes* (Transia, Diffchamb Ltd), les Dynabeads anti-*Listeria* basées sur la séparation immunomagnétique (Dynal Ltd), le test ELISA *Listeria* UniQueTM ELISA (TECRA), le test d'agglutination au latex Microscreen *Listeria* (Microgen BioProducts Ltd), et le test EIA *Listeria* Rapid Test (Oxoid).

d) Méthodes basées sur la reconnaissance des acides nucléiques

Un certain nombre de méthodes basées sur la reconnaissance des acides nucléiques ont été développées pour l'identification de *L. monocytogenes* dans les aliments. Quelques-unes d'entre elles ont été validées par un ou plusieurs organismes de validation et sont commercialement disponibles (49). Parmi les nouvelles séquences cibles, on note le gène de la métalloprotéase (Kit de détection LightCycler foodproof *Listeria monocytogenes*, Roche Applied Science), le gène *prfA* (54) et le gène *ssrA* (50) dans un système de PCR en temps réel.

i) Test GENE-TRAK *Listeria*

Le test GENE-TRAK *Listeria* est une méthode colorimétrique d'hybridation de l'ADN pour la détection de séquences de *Listeria*, qui a été validée par l'AOAC comme méthode 993.09 (7) utilisée pour les produits laitiers, les viandes et les produits de la mer. Ce test a aussi été validé par l'AFNOR. Compte tenu des réactions faussement positives, les échantillons positifs doivent être confirmés par des méthodes bactériologiques de référence.

Les échantillons trouvés positifs par ce test d'hybridation de l'ADN doivent être confirmés par isolement de la suspension en solution physiologique tamponnée au phosphate sur une gélose sélective *Listeria* et les confirmations biochimiques doivent être poursuivies sur les isollements présomptifs de *Listeria* comme décrit dans la méthode FDA.

Le test GENE-TRAK *Listeria* est commercialement disponible chez GENE-TRAK™ Systems, 94 South Street, Hopkinton, MA 01748, USA.

ii) Système BAX®

L'USDA-FSIS a adopté le système BAX® basé sur une PCR (Qualicon) (64) comme une nouvelle méthode de recherche de *L. monocytogenes* dans les échantillons enrichis de viandes et de volaille. Il diminue le temps nécessaire à identifier les échantillons négatifs à 24 h et diminue le nombre de résultats faux positifs avec une limite de détection inférieure à 1 ufc/g dans 25 g d'échantillon. Tous les échantillons qui sont présumés positifs pour *L. monocytogenes* sont ensuite soumis à une confirmation bactériologique par les méthodes conventionnelles.

iii) Test GENE-TRAK test pour *Listeria monocytogenes*

Le test GENE-TRAK pour *L. monocytogenes* (GENE-TRAK™ Systems) est une méthode basée sur une sonde d'hybridation validée par l'AFNOR (15).

iv) Test de confirmation Gen-Probe (AccuProbe®) *Listeria monocytogenes*

Le test Gen-Probe (AccuProbe®) *Listeria monocytogenes Confirmatory Test* (Gen-Probe) est une autre méthode basée sur une sonde d'hybridation validée par l'AFNOR (15).

v) Méthode AD713

La FDA utilise une méthode AD713 (33) basée sur des sondes correspondant aux gènes codant la protéine d'invasion et pour l'hémolysine (hly) de *L. monocytogenes*. Cette méthode associe la détection du gène de l'hémolysine de *L. monocytogenes* (aussi appelée listeriolysine O) par l'utilisation d'une sonde oligonucléotidique AD13, avec la détection du gène de la protéine associée à l'invasion par une sonde synthétique, AD07. Les deux sondes sont utilisées en association (désignée AD713) pour éviter des résultats faux négatifs du fait de mutation silencieuse dans le gène (modification du nucléotide qui peut modifier la fixation sur la sonde mais ne change pas la fonction du gène). Les échantillons positifs doivent être confirmés par les procédures conventionnelles décrites par la méthode FDA.

D'autres méthodes commercialement disponibles basées sur la reconnaissance des acides nucléiques comprennent le test PCR Foodproof® *Listeria monocytogenes* (Biotecon Diagnostics) et le test PCR PROBELIA™ (*L. monocytogenes*) (Sanofi Diagnostics). L'application de la PCR en temps réel a aussi été développée en tant que méthode quantitative de détection spécifique pour *L. monocytogenes*, (18, 36) et a montré un bon potentiel pour l'analyse en routine. Le kit IQ-Check *Listeria monocytogenes* (pour tous les aliments et les échantillons de l'environnement) mise au point par Bio-Rad et le GeneDisc (pour tous les aliments à l'exception des produits laitiers) développé par GeneSystems, France, sont basés sur des PCR en temps réel et ont été validés par l'AFNOR (2).

Tableau 2. Systèmes conventionnels utilisant des anticorps disponibles dans le commerce pour le dépistage rapide de *Listeria* et la confirmation¹

Test	Niveau d'identification	Principe	Temps approx. du test ²	Fabricant	Utilisation principale
MICRO-ID <i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i> / <i>innocua</i> complex	Réaction enzymatique	24 h	Organon Teknika	Confirmation
Vitek System	<i>L. monocytogenes</i> / <i>innocua</i> complex	Tests Biochimiques	24 h	bioMérieux	Confirmation
API <i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Tests Biochimiques	24 h	bioMérieux	Confirmation
MicroLog System	<i>L. monocytogenes</i>	Substances source de carbone	4 ou 24 h	Biolog	Confirmation
MICROBACT 12L	<i>L. monocytogenes</i>	Utilisation carbohydate et test de micro hémolyse	4-6 ou 24 h	Microgen	Confirmation
Sherlock Microbial Identification System (MIS)	<i>L. monocytogenes</i> / <i>innocua</i> complex	Basé sur les acides gras	90 min	Microbial ID	Confirmation
Microscreen	<i>Listeria</i> spp.	Agglutination Latex	1 min	Microgen BioProducts	Confirmation
<i>Listeria</i> VIP	<i>Listeria</i> spp.	Immuno-chromatographie	2 min après enrichissement	BioControl Systems	Dépistage
Dynabeads anti- <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp	Séparation Immunomagnétique	48 h à 72 h	Dynal	Dépistage
REVEAL for <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	Immuno-chromatographie	43 h	Neogen	Dépistage
Clearview <i>Listeria</i> (Oxoid <i>Listeria</i> Rapid Test)	<i>Listeria</i> spp.	Immuno-chromatographie	43 h	Oxoid	Dépistage
Listertest	<i>Listeria</i> spp.	Séparation immunomagnétique	24 à 48 h	Vicam	Dépistage

1 : Adapté et développé de la référence 15

2 : Lorsqu'il est utilisé pour la confirmation, le temps indiqué pour le test ne comprend pas l'enrichissement et l'isolement sur gélose

Tableau 3. Quelques dispositifs ELISA disponibles dans le commerce pour le dépistage rapide de *Listeria*

Test	Niveau d'identification	Principe	Temps approx. du test	Fabricant	Utilisation principale
<i>Listeria</i> Tek	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 h	Organon Teknika	Dépistage
TECRA <i>Listeria</i> Visual Immunoassay (TLVIA)	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 h	TECRA	Dépistage
Assurance <i>Listeria</i> EIA	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 h	BioControl Systems	Dépistage
VIDAS <i>Listeria</i> (LIS)	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 h	bioMérieux	Dépistage
VIDAS <i>Listeria monocytogenes</i> (LMO)	<i>L. monocytogenes</i>	ELISA	50 h	bioMérieux	Dépistage
Transia Plate <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 h	Diffchamb	Dépistage
Transia Plate <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	ELISA	50 h	Diffchamb	Dépistage
EIAFOSS <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	ELISA automatisé	48 h	Foss Electric	Dépistage

Tableau 4. Quelques dispositifs moléculaires disponibles dans le commerce pour le dépistage rapide de *Listeria* et la confirmation¹

Test	Niveau d'identification	Principe	Temps approx. du test	Fabricant	Utilisation principale
Gen-Probe (AccuProbe)	<i>L. monocytogenes</i>	Hybridation d'une sonde avec l'acide nucléique (HSAN)	30 min	Gen Probe	Confirmation
VIT Listeria Kit	<i>L. monocytogenes</i> / <i>Listeria</i> spp.	HSAN	3 h	Vermicon	Confirmation
Epreuve pour aliments <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	PCR	48 h	Biotecon Diagnostics	Dépistage
Epreuve Gene Trak <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	HSAN	50 h	Gene Trak	Dépistage
Test Gene Trak pour <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	HSAN	50 h	Gene Trak	Dépistage
BAX pour dépistage de <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	PCR	48 h	Qualicon	Dépistage
BAX pour le dépistage du genre <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	PCR	48 h	Qualicon	Dépistage
PROBELIA	<i>L. monocytogenes</i>	PCR	48 h	Sanofi Diagnostics Pasteur	Dépistage
Kit LightCycler de détection dans les aliments de <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	PCR en temps réel	65 min ³	Roche Applied Science	Dépistage
Kit LightCycler de détection dans les aliments de <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	PCR en temps réel	75 min ³	Roche Applied Science	Dépistage

1 : Adapté de la référence 15

2 : Lorsqu'il est utilisé pour la confirmation, le temps indiqué pour le test ne comprend pas l'enrichissement et l'isolement sur gélose

3 : Après une culture d'enrichissement

e) Méthodes de typage

L'identification réglementaire de *L. monocytogenes* ne nécessite pas le typage spécifique des isolats. Néanmoins, les schémas de typage peuvent être utiles pour les investigations lors d'épizooties, le suivi dans l'environnement et la surveillance en santé publique.

Listeria monocytogenes peut être caractérisée par un certain nombre d'approches différentes comprenant le sérotypage, la lysotypie, l'électrophorèse des enzyme multilocus (MEE), l'analyse de restriction enzymatique de l'ADN (soit en utilisant des enzymes à haute fréquence de coupure et une électrophorèse conventionnelle pour séparer les fragments, soit en utilisant les enzymes à sites de coupure rares et l'électrophorèse en champ pulsé [PFGE] pour séparer les fragments), le typage basé sur le séquençage d'acides nucléiques, l'analyse avec des micro-puces, le polymorphisme du locus intergénique après amplification (AILP pour *amplified intergenic locus polymorphism*) et l'amplification au hasard de séquences d'ADN (RAPD pour *Random Amplification of Polymorphic DNA*).

Compte tenu de la nécessité de disposer de réactifs spécifiques, des procédures d'assurance-qualité et de certains équipements sophistiqués, il est recommandé de soumettre les isolats pour sérotypage à des centres de référence appropriés. Une liste des centres internationaux et des méthodes de typage réalisées est mentionnée en réf. 16 (pp. 258-259).

i) Sérotypage

Les souches de *Listeria* sont dotées de 13 sérotypes différents basés sur la combinaison de leurs antigènes somatiques (O) et flagellaires (H). Bien que tous soient considérés comme potentiellement pathogènes, la plupart des isolats cliniques (> 95 %) appartiennent à 3 sérotypes, 1/2a, 1/2b, et 4b. Comparé à d'autres méthodes de typage, le sérotypage a un pouvoir de discrimination faible, mais peut apporter une information

de valeur pour distinguer les isolats non impliqués dans une épizootie. Les isolats des aliments et de l'environnement sont souvent non typables avec les sérums de référence.

ii) Lysotypie

Le typage par les bactériophages est une technique ayant un bon pouvoir de discrimination et qui peut être utilisée pour typer un grand nombre d'isolats. Néanmoins, les sets de phages disponibles actuellement ne sont pas capables de typer une grande proportion de souches (20 à 51 % dans le cas de set de lysotypie international). Du fait des exigences de normalisation rigoureuse et de la nature biologique des réactifs, cette technique est réalisée uniquement dans les laboratoires spécialisés de référence nationaux et internationaux et est sujette à des variabilités biologiques et expérimentales importantes. En dépit de ces problèmes, la lysotypie reste la méthode la plus pratiquée et adaptée lors d'épizooties importantes (31).

iii) Electrophorèse des enzymes multilocus (MEE)

Cette technique s'appuie sur les différences des séquences d'acides nucléiques qui entraînent des mobilités électrophorétiques différentes d'enzymes métaboliques choisies, dans un gel d'amidon, et peut être appliquée au typage de souches apparentées. Néanmoins le MEE apporte seulement une discrimination modérée lorsqu'il est utilisé pour des investigations épidémiologiques impliquant *L. monocytogenes*. Certaines souches peuvent avoir perdu leur activité enzymatique et par conséquent la technique peut devenir compliquée. Du fait de sa nature, les résultats inter-laboratoires sont très variables (31).

iv) Analyse de la restriction des endonucléases de l'ADN chromosomal

L'analyse de la restriction des endonucléases de l'ADN chromosomique (REA) est une méthode utile pour le typage de *L. monocytogenes*. Du fait que ces enzymes sont très spécifiques dans la reconnaissance des séquences nucléotidiques, les fragments résultant de la digestion de l'ADN, de différentes tailles et mobilités électrophorétiques, reflètent les différences génomiques à l'origine de profils spécifiques parmi les autres souches autrement apparentées. Compte tenu de la spécificité des endonucléases de restriction, la méthode est hautement reproductible. Parmi les endonucléases de restriction testées dans l'étude multicentrique de l'OMS (Organisation mondiale de la santé), *HaeIII*, *HhaI* and *CfoI* sont les plus intéressantes (31). Néanmoins, du fait d'un grand nombre de sites de reconnaissance enzymatique sur le génome bactérien, des profils complexes peuvent survenir parfois, avec des bandes qui se chevauchent ou faiblement résolues qui sont difficiles à interpréter. La technique par conséquent est inadaptée pour la comparaison d'un grand nombre de profils de souches ou pour la construction de bases de données évolutives (31).

En associant le REA avec l'hybridation Southern, avec une sonde chromosomique marquée, seuls les fragments de restriction particuliers associés au loci chromosomiques correspondants seront détectés, ce qui réduit significativement le nombre de fragments d'ADN à analyser. Cette technique est appelée analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP). Quand des sondes ribosomales ARN/ADN sont utilisées, seuls les fragments particuliers associés aux loci chromosomiques pour l'ARN sont détectés. Cette technique est appelée ribotypage et a été largement utilisée pour le typage de *L. monocytogenes*, principalement avec l'utilisation de l'endonucléase de restriction *EcoRI*. Cependant, cette technique a été trouvée moins discriminante que la lysotypie, le REA ou le MEE. Qualicon a conçu un système automatique de ribotypage, le « RiboPrinter », qui réalise les analyses et conserve les profils de ribotype des bactéries dont *Listeria*.

Quand les endonucléases de restriction à faible fréquence de coupure, sont utilisées pour la digestion de l'ADN chromosomique brut, tels que *Apal*, *SmaI*, *NotI* and *Ascl*, de très grands fragments sont obtenus. Du fait de leur taille, ces grands fragments ne peuvent pas être séparés selon les conditions conventionnelles par électrophorèse en gel d'agarose. Cependant, en changeant périodiquement l'orientation du champ électrique dans le gel, par pulsation, les grands fragments peuvent migrer à travers la matrice d'agarose et sont séparés selon leur différence de taille. Cette technique est appelée électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et a révolutionné la séparation précise des fragments d'ADN de plus de 40 kb. PFGE a été utilisée pour le typage de *L. monocytogenes* et la méthode a montré une très bonne discrimination et reproductibilité. La PFGE est particulièrement utile pour le typage des isolats de sérotype 4b, qui ne sont pas typés de façon satisfaisante par la plupart des autres méthodes. Les principaux inconvénients de la méthode sont le temps nécessaire pour réaliser l'analyse (2 à 3 jours), les grandes quantités d'enzymes de restriction nécessaires et coûteuses ainsi que la nécessité de disposer d'un appareillage coûteux spécialisé (31). Le CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) des États-Unis d'Amérique a établi un réseau de laboratoires de santé publique et d'analyses alimentaires PulseNet, qui réalise en routine le typage de bactéries pathogènes transmises par les aliments par PFGE. Les Laboratoires PulseNet utilisent des protocoles hautement normalisés et peuvent rapidement comparer les profils PFGE des différentes localisations via Internet. *Listeria monocytogenes* a été ajoutée à PulseNet en 1999 (63).

v) Typage basé sur la séquence des acides nucléiques

Bien que des données sur l'analyse des séquences de gènes pour le typage des souches de *L. monocytogenes* existent, la détermination des variations alléliques de multiples gènes a récemment été introduite comme une méthodologie de typage de ce micro-organisme très prometteuse. Cette approche a été identifiée pour une poignée d'autres micro-organismes et est connue sous le nom de MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) (62). L'amplification directe et le séquençage (19, 56), de même que l'approche alternative qui cible les modifications génétiques directement sur un support de puces à ADN (55) ont toutes les deux été utilisées avec une bonne discrimination entre les souches analysées. Comme le MLST est basé sur les séquences nucléotidiques, il est hautement discriminant et apporte des résultats non ambigus.

De courtes séquences répétitives sont fréquemment trouvées chez les bactéries et au sein des parties palindromiques, connues aussi sous le nom de *repetitive extragenic palindromes* (REP). Elles sont les plus représentatives des séquences répétitives chez les bactéries. Ces REP sont présent chez *L. monocytogenes* et une PCR basée sur les séquences de ces entités (rep-PCR) a permis avec succès de déterminer les sous-types des souches de cette bactérie. Les 4 principaux groupes de la souche identifiés par cette méthode correspondent aux lieux d'origine de leur isolement (43).

vi) Amplification au hasard de l'ADN polymorphique

Si des amorces sélectionnées arbitrairement sont utilisées pour la PCR en conditions de faible stringence, avec comme cible l'ADN chromosomique de *L. monocytogenes*, les profils des amplimères obtenus sont utiles pour le typage des souches. La RAPD est une méthode alternative à la lysotypie hautement discriminante. Cependant en dépit de sa relative simplicité et de son pouvoir discriminant, son principal obstacle est la faible reproductibilité des profils. Les conditions de faible stringence pour l'appariement des amorces entraînent une polymérisation avec une efficacité variable, et par conséquent les quantités d'ADN produit peuvent être variables parmi les différents amplimères pour un isolat donné, ce qui fait que l'interprétation des profils RAPD est difficile. La technique nécessite un grand effort de normalisation de la procédure et de cohérence pour obtenir des résultats exploitables (31).

A partir des résultats de l'étude multicentrique du centre de l'OMS pour le typage de *L. monocytogenes* (27), qui compare plusieurs méthodes de typage différentes sur un panel d'isolats bien défini, le sérotypage, la lysotypie, le REA, le PFGE et le RAPD ont été sélectionnés pour une normalisation en Phase II. Cette action devrait aboutir à la sélection d'un groupe de méthodes normalisées pour le typage de *L. monocytogenes* (31).

2. Épreuves sérologiques

Les épreuves sérologiques ne sont pas traditionnellement utilisées pour le diagnostic de la listériose. Elles sont majoritairement peu fiables, manquant de sensibilité et de spécificité. Un certain nombre de support incluant l'ELISA, la fixation du complément, et la microagglutination ont montré peu de succès dans le diagnostic de la listériose humaine bactériologiquement confirmée, même en l'absence d'immunosuppression. Des réactions croisées considérables avec les déterminants antigéniques d'autres organismes Gram-positif ont été observés. D'autre part, *L. monocytogenes* est un organisme ubiquitaire et l'exposition régulière des animaux et des hommes à ce micro-organisme est très fréquente. Beaucoup d'individus sains sont porteurs au niveau intestinal (2 à 6 %) et une prévalence d'anticorps anti-*L. monocytogenes* dans le sérum a été retrouvée jusqu'à 53 % chez l'homme. Les taux de portage pour l'animal sont similaires à ceux des humains, avec des différences en fonction de l'espèce et un taux un peu plus élevé durant la saison de stabulation comparé à celui des animaux au pâturage (37, 38).

La découverte de l'hémolysine, de *L. monocytogenes*, la listeriolysine O (LLO), comme facteur majeur de virulence et qui peut stimuler la réponse en anticorps a récemment redonné de l'intérêt dans la possibilité d'utiliser les épreuves sérologiques pour le diagnostic de la listériose, particulièrement au niveau du système nerveux central, à partir de sang stérile et de liquide céphalorachidien, et pour la listériose périnatale. Un test ELISA indirect basé sur la détection des anti-LLO a été utilisé pour le diagnostic expérimental de la listériose chez le mouton (47). Cependant, la LLO est antigéniquement apparentée à un certain nombre de cytolysines, incluant la streptolysine O (SLO) de *Streptococcus pyogenes*, la pneumolysine de *S. pneumoniae* et la perfringolysine de *Clostridium perfringens*. Des problèmes de réactions croisées des anticorps anti-LLO avec ces cytolysines, particulièrement la SLO et la pneumolysine, ont gêné le développement de tests basés sur la détection des anticorps anti-LLO sérologiquement fiables. De plus, des anticorps anti-LLO ont été retrouvés dans une certaine proportion chez des individus sains et des maladies infectées par d'autres bactéries, champignons ou virus (27 %, tous ensemble), bien que ce soit à des titres plus faibles que ceux des patient atteints de listériose. L'absorption du sérum à tester avec des SLO est efficace seulement en partie pour éliminer les réactions croisées. Ces essais expérimentaux ont été utilisés dans certaines investigations épidémiologiques et comme support pour le diagnostic d'infections du système nerveux central à culture négative. Des formes recombinantes de la LLO ont été explorées comme alternatives à la LLO sauvage comme antigène pour le diagnostic dans les tests de

Western blot. Ceci est actuellement un secteur en développement et nous devons attendre le développement d'épreuves sérologiques validées et fiables pour le diagnostic de la listériose.

La recherche par immunohistochimie des antigènes de *L. monocytogenes* dans des tissus fixés au formol s'est révélée plus sensible que l'isolement par ensemencement direct et enrichissement pour le diagnostic de la forme encéphalitique de la maladie chez les ruminants (20, 44).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il a été montré qu'il était très difficile de développer des vaccins efficaces contre *L. monocytogenes* qui en tant qu'organisme intracellulaire nécessite des cellules effectrices de type T pour une réponse immunitaire efficace. Des vaccins expérimentaux sont en train d'être explorés en animalerie pour apporter une protection contre l'infection à *L. monocytogenes* par différentes approches, mais ces vaccins ne sont pas près d'être disponibles pour utilisation chez l'homme et chez l'animal d'élevage. Ces approches expérimentales comprennent l'immunisation avec des plasmides ADN, des molécules CD 40 avec des *L. monocytogenes* tuées par la chaleur, l'inoculation de mutants déficients en LLO sous forme de liposome de LLO encapsulés et l'immunisation par des antigènes de listéria et la fraction IL-12.

Les *L. monocytogenes* génétiquement modifiées sont aussi considérées comme des vecteurs de vaccins efficaces pour l'expression, la sécrétion et la distribution intracellulaire d'antigènes étrangers pour l'induction d'une réponse immune potentielle contre les antigènes viraux et les cellules tumorales.

Quoiqu'il en soit, le moyen le plus facile et pratique de réduire le risque de listériose chez l'homme se trouve dans les mesures de régime et de préparation des aliments qui ne réduit pas seulement le risque de contracter la listériose, mais contribue aussi à la prévention des autres infections habituelles transmises par les aliments telles que celles causées par *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* et *Campylobacter*. Ces mesures préventives comprennent la cuisson soignée des produits crus d'origine animale, la séparation des produits non cuits des légumes, des aliments de cuisine et des produits prêts à être consommés, le lavage soigneux des légumes avant de les consommer, le lavage des mains, des couteaux et des planches à découper après avoir manipulé des produits non cuits, et l'élimination du lait non pasteurisé ou des produits dérivés. Les personnes immunodéprimées, les femmes enceintes et les autres groupes à risque pour la listériose doivent éliminer les aliments qui ont été épidémiologiquement liés à la maladie, par exemple, les fromages à pâte molle et le pâté. Ces individus doivent aussi éviter les produits prêts à être consommés, à moins qu'ils aient été chauffés à la vapeur avant d'être consommés.

L'industrie agro-alimentaire et les agences de santé publique jouent un rôle de pivot dans la prévention de la listériose transmise par les aliments en développant et en mettant en place des programmes efficaces d'HACCP pour réduire la présence de *L. monocytogenes* à tous les points critiques de la chaîne de production et de distribution (de la fourche à la fourchette).

De même, le manque de vaccins bien définis et testés pour l'utilisation animale, signifie que le contrôle de la listériose chez l'animal est plus réalisable par prévention des conditions environnementales qui favorisent son apparition. Il y a un lien bien établi entre les ensilages destinés aux animaux et la listériose et, du fait que *L. monocytogenes* est largement disséminée dans la nature, entre les animaux et les oiseaux jouant le rôle de porteurs sains, la contamination des ensilages est fréquente. Par conséquent, l'effort doit être placé sur la réduction des risques de multiplication de l'organisme qui apparaît plus fréquemment à des valeurs de pH supérieures à 5, notamment là où une fermentation inefficace est survenue et où il y a en même temps croissance de moisissures. Tous les efforts doivent être mis sur la production d'ensilages de bonne qualité, avec de l'herbe fraîchement coupée, une concentration minimale de souillure et de fèces, ainsi que des conditions optimales pour une fermentation anaérobie qui garantit un pH inférieur à 5 ; à ce pH, la croissance de *Listeria* spp. est inhibée. Le meilleur ensilage pour l'alimentation animale doit être sélectionné, spécialement pour les moutons, en rejetant l'ensilage présentant des signes évidents de moisissures. L'ensilage situé sur une profondeur de quelques centimètres depuis le sommet et sur les côtés de l'ouverture de la balle ou du sac doit être également rejeté. Les surplus de l'ensilage devront être éliminés (48).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANDREWS W. (2002). Current State of Conventional Microbiological Methodology for the Examination of Food. In: Workshop 102–15. Microorganisms in Foods: Now What? American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

2. AFAQ¹-AFNOR² Certification (2005). Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse. Liste des méthodes validées au juin 2005. Bagneux, France.
3. AFNOR (1997). Norme Française NF V 08-055. Microbiologie des aliments. Recherche de *Listeria monocytogenes*. Méthode de Routine. Paris, France.
4. AFNOR (2000). Normalisation Française XP V 08-062. Microbiologie des aliments. Méthode de dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Méthode de Routine. Paris, France.
5. AOAC³ OFFICIAL METHOD 992.18. (2000). *Listeria* species. Biochemical Identification Method (MICRO-ID *Listeria*). In: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volume I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, 141–144.
6. AOAC OFFICIAL METHOD 992.19. (2000). *Listeria* species. Biochemical Identification Method (Vitek GPI and GNI+). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. In: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volume I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, 144–147.
7. AOAC OFFICIAL METHOD 993.09. (2000). *Listeria* in Dairy Products, Seafoods, and Meats. Colorimetric Deoxyribonucleic Acid Hybridization Method (GENE-TRAK *Listeria* Assay). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. In: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volume I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, 147–150.
8. AOAC OFFICIAL METHOD 993.12. (2000). *Listeria monocytogenes* in Milk and Dairy Products. Selective Enrichment and Isolation Method. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. In: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volume I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, 138–141.
9. AOAC OFFICIAL METHOD 994.03. (2000). *Listeria monocytogenes* in Dairy Products, Seafoods, and Meats. Colorimetric Monoclonal Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method (*Listeria*-Tek). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. In: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volume I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, 150–152.
10. AOAC OFFICIAL METHOD 995.22. (2000). *Listeria* in Foods. Colorimetric Polyclonal Enzyme Immunoassay Screening Method (TECRA[®] *Listeria* Visual Immunoassay [TLVIA]). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. In: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volume I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, 152–155.
11. AOAC OFFICIAL METHOD 996.14. (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* and Related *Listeria* Species Detection in Selected Foods and from Environmental Surfaces. Assurance[®] Polyclonal Enzyme Immunoassay (EIA). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. In: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volume I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, 156B–156D.
12. AOAC OFFICIAL METHOD 997.03. (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* and Related *Listeria* spp. in Selected Foods and from Environmental Surfaces. Visual Immunoprecipitate Assay (VIP). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. In: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volume I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, 157–159.
13. AOAC OFFICIAL METHOD 999.06. (2003). *Listeria* in Foods. Enzyme-Linked Immunofluorescent Assay (ELFA). VIDAS LIS Assay Screening Method. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. In: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volume I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, 159–163.
14. AOAC OFFICIAL METHOD 2002.09. (2003). *Listeria* in Foods. Colorimetric Polyclonal Enzyme Immunoassay Screening Method (TECRA[®] *Listeria* Visual Immunoassay) Using TECRA *Listeria* Enrichment Broth. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. In: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volume I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, 155–156B.

1 AFAQ: Association française pour le management et l'amélioration de la qualité

2 AFNOR: Association Française de Normalisation

3 AOAC: Association of Official Analytical Chemists

15. BAYLIS C. (2000). The Catalogue of Rapid Microbiological Methods, Fourth Edition, Review No. 1, Campden & Chorleywood Food Research Association, Chipping Campden, Gloucestershire, UK.
16. BILLE J. & ROCOURT J. (1996). WHO International Multicenter *Listeria monocytogenes* Subtyping Study – rationale and set-up of the study. *Int. J. Food Microbiol.*, **32**, 251–262.
17. CABANES D., SOUSA S., CEBRIÁ A., LECUIT M., GARCÍA-DEL PORTILLO F. & COSSART P. (2005). Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *The EMBO Journal*, **24** (15), 2827–2838. (Advance online publication, July 14 2005; doi:10.1038/sj.emboj.7600750.)
18. CADY N.C., STELICK S., KUNNAVAKKAM V. & BATT C.A. (2005). Real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* using an integrated microfluidics platform. *Sensors and Actuators B.*, **107**, 332–341.
19. CAI S., KABUKI D.Y., KUAYE A.Y., CARGIOLI T.G., CHUNG M.S., NIELSEN R. & WIEDMANN M. (2002). Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3319–3325.
20. CAMPERO C.M., ODEÓN A.C., CIPOLLA A.L., MOORE D.P., POSO M.A. & ODRIOZOLA E. (2002). Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. *J. Vet. Med. [B]*, **49**, 379–383.
21. CLARK R.G., GILL J.M. & SWANNEY S. (2004). *Listeria monocytogenes* gastroenteritis in sheep. *NZ Vet. J.*, **52**, 46–47.
22. COSSART P. & PORTNOY D.A. (2000). The cell biology of invasion and intracellular growth by *Listeria monocytogenes*. In: Gram-Positive Pathogens, Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A. & Rood J.A., eds. ASM Press, Washington, DC, USA, 507–515.
23. DONNELLY C.W. (1999). Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Ryser E. & Marth E., eds. Marcel Dekker, New York, NY, USA, 225–260.
24. DUNBAR S.A., VANDER ZEE C.A., OLIVER K.G., KAREM K.L. & JACOBSON J.W. (2003). Quantitative multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. *J. Microbiol. Methods*, **53**, 245–252.
25. DUSSURGET O., CABANES D., DEHOUX P., LECUIT M., BUCHRIESER C., GLASER P. & COSSART P. (2002). *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol. Microbiol.*, **45**, 1095–1106.
26. ELD K., DANIELSSON-THAM M.-L., GUNNARSSON A. & THAM W. (1993). Comparison of a cold enrichment method and the IDF method for isolation of *Listeria monocytogenes* from animal autopsy material. *Vet. Microbiol.*, **36**, 185–189.
27. FARBER J.M., ED. (1996). Molecular typing of *Listeria*. *Int. J. Food Microbiol.*, Special Issue, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 251–355.
28. FENLON D.R. (1985). Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *J. Appl. Bacteriol.*, **59**, 537–543.
29. GAHAN C.G.M. & HILL C. (2005). Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *J. Appl. Microbiol.*, **98**, 1345–1353.
30. GOUWS P.A. & LIEDEMANN I. (2005). Evaluation of diagnostic PCR for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products. *Food Technol. Biotechnol.*, **43**, 201–205.
31. GRAVES L.M., SWAMINATHAN B. & HUNTER S. (1999). Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Ryser E. & Marth E., eds. Marcel Dekker, New York, NY, USA, 279–297.
32. GRAY M.L., STAFSETH J., THORP JR F., SHOLL L.B. & RILEY W.F. (1948). A new technique for isolating *Listerellae* from the bovine brain. *J. Bacteriol.*, **55**, 471–476.
33. HILL W.E., DATTA A.R., FENG P., LAMPEL K.A. & PAYNE W.L. (2001). Identification of foodborne bacterial pathogens by gene probes: *Listeria monocytogenes*: combination of invasion-associated protein (*iap*) and hemolysin (*hly*) gene probes – AD713. In: *Bacteriological Analytical Manual Online*, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-24.html>, 24.16 – 24.17.

34. HIRD D.W. & GENIGEORGIS C. (1990). In: *Listeriosis in Food Animals: Clinical Signs and Livestock as a Potential Source of Direct (Nonfoodborne) Infection for Humans*, Miller A.J., Smith J.L. & Somkutti G.A., eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 31–39.
35. HITCHINS A.D. (1998). *Listeria monocytogenes*. In: *Bacteriological Analytical Manual*, US Food and Drug Administration, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, 10.01–10.11
36. HOUGH A.J., HARBISON S.A., SAVILL M.G., MELTON L.D. & FLETCHER G. (2002). Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. *J. Food Prot.*, **65**, 1329–1332.
37. HUSU J.R. (1990). Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *J. Vet. Med. [B]*, **37**, 276–282.
38. IIDA T., KANZAKI M., MARUYAMA T., INOUE S. & KANEUCHI C. (1991). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **53**, 873–875.
39. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. International Standard ISO 11290-1, Geneva, Switzerland.
40. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration method. International Standard ISO 11290-2, Geneva, Switzerland.
41. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. International Standard ISO 11290-1, AMENDMENT 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data, Geneva, Switzerland.
42. JACQUET C., GOUIN E., JEANNEL D., COSSART P. & ROCOURT J. (2002). Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 616–622.
43. JERSEK B., GILOT P., GUBINA M., KLUN N., MEHLE J., TCHERNEVA E., RIJPEMS N. & HERMAN L. (1999). Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 103–109.
44. JOHNSON G.C., FALES W.H., MADDOX C.W. & RAMOS-VERA J.A. (1995). Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**, 223–228.
45. LOPEZ J., KARPOWICZ E., HARGROVE W. & BECKER S. (1992). Comparison of the Intestinal Cell Uptake of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated From Human Clinical Cases of Listeriosis and From Meat Products, 92nd General Meeting Abstracts, American Society for Microbiology, P-38, 330.
46. LOPEZ J., SINGH U., KARPOWICZ E., HARGROVE W. & ADAMS S. (1993). Comparison of the Intracellular Survival and Multiplication of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated From Human Clinical Cases of Listeriosis and From Meat Products, 93rd General Meeting Abstracts, American Society for Microbiology, P-80, 346.
47. LOW J.C., DAVIES R.C. & DONACHIE W. (1992). Purification of listeriolysin O and development of an immunoassay for diagnosis of listeric infection in sheep. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2505–2708.
48. LOW J.C. & DONACHIE W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet. J.*, **153**, 9–29.
49. NORTON D.M. (2002). Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. *J. AOAC Int.*, **85** (2), 505–515.
50. O'GRADY J., SEDANO-BALBÁS S., MAHER M., SMITH T. & BARRY T. (2008). Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. *Food Microbiol.* **25**, 75–84.
51. QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B. & CARTER G.R. (1999). *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby International, Edinburgh, Scotland, UK.
52. ROBERTS A.J. & WIEDEMANN M. (2003). Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 904–918.
53. ROCOURT J. & BILLE J. (1997). Foodborne listeriosis. *World Health Stat. Q.*, **50**, 67–73.

54. ROSSMANITH P., KRASSNIG M., WAGNER M. & HEIN, I. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. *Res. Microbiol.*, **157**, 763-771.
55. RUDI K., KATLA T. & NATERSTAD K. (2003). Multi locus fingerprinting of *Listeria monocytogenes* by sequence-specific labeling of DNA probes combined with array hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.*, **220**, 9-14.
56. SALCEDO C., ARREAZA L., ALCALA B., DE LA FUENTE L. & VAZQUEZ J.A. (2003). Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 757-762.
57. SCHLECH W.F. 3RD, LAVIGNE P.M., BORTOLUSSI R.A., ALLEN A.C., HALDANE E.V., WORT A.J., HIGHTOWER A.W., JOHNSON S.E., KING S., NICHOLLS E.S. & BROOME C.V. (1983). Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.*, **318**, 203-206.
58. SEWELL A.M., WARBURTON D.W., BOVILLE A., DALEY E.F. & MULLEN K. (2003). The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **81**, 123-129.
59. SILBERNAGEL K.M., JECHOREK R.P., KAUFER A.L., JOHNSON R.L., ALEO V., BROWN B., BUEN M., BURESH J., CARSON M., FRANKLIN J., HAM P., HUMES L., HUSBY G., HUTCHINS J., JECHOREK R., JENKINS J., KAUFER A., KEXEL N., KORA L., LAM L., LAU D., LEIGHTON S., LOFTIS M., LUC S., MARTIN J., NACAR I., NOGLE J., PARK J., SCHULTZ A., SEYMORE D., SMITH C., SMITH J., THOU P., ULMER M., VOSS R. & WEAVER V. (2005). Evaluation of the VIDAS *Listeria* (LIS) immunoassay for the detection of *Listeria* in foods using demi-Fraser and Fraser enrichment broths, as modification of AOAC Official Method 999.06 (AOAC Official Method 2004.06). *J. AOAC Int.*, **88**, 750-760.
60. SLEATOR R.D., WEMEKAMP-KAMPHUIS H.H., GAHAN C.G.M., ABEE T. & HILL C. (2005). A PrfA-regulated bile exclusion system (BilE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.*, **55**, 1183-1195.
61. SLUTSKER L. & SCHUCHAT A. (1999). Listeriosis in humans. In: *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, Ryser E. & Marth E., eds. Marcel Dekker, New York, NY, USA, 75-95.
62. SPRATT B.G. (1999). Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 312-316.
63. SWAMINATHAN B. (2001). *Listeria monocytogenes*. In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Second Edition, Doyle M.P., Beuchat L.R. & Montville T.J., eds. ASM Press, Washington, DC, USA, 383-409.
64. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (FSIS) (2005). FSIS Procedure for the Use of *Listeria monocytogenes* BAX[®] Screening Test, Effective March 15, 2005. In: Microbiology Laboratory Guidebook On Line:

http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp, MLG 8A.01, 1-4.
65. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (FSIS) (2002). Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples, Revision 03, April 29, 2002. In: Microbiology Laboratory Guidebook On Line:

http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp, MLG 8.03 pp 1-21.
66. WALKER J.K. & MORGAN J.H. (1993). Ovine ophthalmitis associated with *Listeria monocytogenes*. *Vet. Rec.*, **132**, 636.
67. WALKER R.L. (1999). *Listeria*. In: Veterinary Microbiology, Hirsh D.C. & Zee Y.C., eds. Blackwell Science, Malden, Massachusetts, USA, 225-228.
68. WESLEY G.N. (1999). Listeriosis in animals. In: *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, Ryser E. & Marth E., eds. Marcel Dekker, New York, NY, USA, 39-73.
69. WIEDMANN M., ARVIK T., BRUCE J.L., NEUBAUER J., DEL PIERO F., SMITH M.C., HURLEY J., MOHAMMED H.O. & BATT C.A. (1997). Investigation of a listeriosis epizootic in sheep in New York state. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 733-737.

*
* *

GALES*

RÉSUMÉ

*Les gales sont des maladies contagieuses de la peau, caractérisées par une dermatite avec formation de croûtes, du prurit et une perte des poils ou des plumes ; ces affections sont dues à plusieurs espèces d'acariens qui creusent des galeries dans la peau ou vivent à la surface de celle-ci. En anglais, la gale est appelée « mange » mais aussi « itch », « scab » ou « scabies » (ce dernier terme devrait être réservé à la gale due à *Sarcoptes scabiei*). Chez les animaux domestiques (bétail, volailles, animaux de compagnie ou de laboratoire), environ 50 espèces d'acariens classés dans 16 familles et 26 genres peuvent provoquer une gale. D'autres affections cutanées (par ex. dermatite, enflures, ampoules, nodules), ainsi que les réactions allergiques vis-à-vis d'autres parasites, les piqûres de tiques, les maladies fongiques ou les réactions aux actions physique ou chimique de plantes peuvent être confondues avec la gale et doivent faire l'objet d'un diagnostic différentiel. Le diagnostic de gale, chez les animaux domestiques, est basé sur les signes cliniques et sur la mise en évidence des parasites ou de leurs stades évolutifs dans le produit de raclage de la peau de l'hôte.*

Identification de l'agent pathogène : *les acariens responsables des gales sont petits (100 à 900 µm), peu chitinisés, se déplacent lentement et vivent en permanence sur leur hôte. Bien que le groupe des acariens soit très divers et ubiquiste, les principales espèces agents des gales appartiennent seulement à deux ordres au sein des Acariformes, les Astigmata et les Prostigmata. Certains genres d'acariens ayant une grande importance économique sont les genres Cheyletiella, Chorioptes, Demodex, Knemidokoptes, Notoedres, Otodectes, Psorobia, Psoroptes et Sarcoptes. Des clés de diagnostic spécialisées et illustrées, des descriptions taxonomiques et des spécimens de référence doivent être consultés afin d'identifier correctement les agents responsables. Des techniques spéciales de prélèvement et un examen microscopique sont en général nécessaires pour le diagnostic. Certaines des caractéristiques de chacun des groupes d'acariens sont mises en évidence dans le chapitre ci-dessous. Bien que peu disponibles, des tests sérologiques ont été développés pour certains acariens et peuvent être utiles dans certaines circonstances.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *aucun vaccin commercial n'est actuellement disponible.*

A. INTRODUCTION

Les gales sont des maladies contagieuses de la peau, caractérisées par une dermatite prurigineuse avec formation de croûtes et une perte des poils ou des plumes ; elles sont due à plusieurs espèces d'acariens qui creusent des galeries dans la peau ou vivent à la surface de celle-ci ; en anglais, la gale est appelée « mange » mais aussi « itch », « scab » ou « scabies » ; ce dernier terme devrait être réservé à la gale due à *Sarcoptes scabiei* (28).

De nombreuses espèces d'acariens provoquent des gales chez des centaines d'espèces d'oiseaux sauvages ou domestiques ou de mammifères. En fait, environ 60 familles d'acariens ont un ou des membres qui vivent sur la peau, les poils ou les plumes des vertébrés homéothermes et sont des agents potentiels de gales. Chez les animaux domestiques (bétail, volailles, animaux de compagnie ou de laboratoire), environ 50 espèces d'acariens classés dans 16 familles et 26 genres peuvent provoquer une gale. Les humains sont des hôtes de l'espèce *S. scabiei* qui est facilement transmise et les gales de l'homme surviennent fréquemment dans les crèches ou les centres de soins pour enfants. Chez l'homme, d'autres acariens peuvent provoquer une maladie transitoire, mais sans persistance de l'infestation.

Les acariens constituent un groupe d'arthropodes, sous-classe des Arachnida, très hétérogène, abondant et ubiquiste avec environ 50 000 espèces décrites. La classification des acariens, en ce qui concerne les niveaux élevés, n'est pas complètement déterminée, mais un consensus s'est établi sur le système suivant qui comprend les

acariens des gales. Les acariens regroupent 3 lignées évolutives principales, Opilioacariformes, Parasitiformes et Acariformes, mais seulement certains acariens provoquent des gales chez les animaux domestiques. Deux lignées au sein des Acariformes comprennent des parasites responsables des gales – les Trombidiiiformes et les Sarcoptiformes. Les Trombidiiiformes comprennent l'ordre des Prostigmata et de nombreuses familles dont 5 comprennent des parasites responsables de gales. Les Sarcoptiformes comprennent deux ordres, les Oribatida et les Astigmata, avec de nombreuses familles dans chacun, mais des parasites responsables de gales sont inclus dans seulement 11 familles d'Astigmata.

D'autres acariens peuvent provoquer des dermatites moins graves chez les animaux et l'homme (39). Certains Parasitiformes (ordre des Gamasida, par ex. *Ornithonyssus*, *Dermanyssus*) et Prostigmata (par ex. *Trombicula* [et autres chiques], *Pymotes*) peuvent piquer temporairement un hôte au cours du repas en provoquant des marques prurigineuses. Certains produits conservés, les nids d'oiseaux et les acariens des habitations (par ex. *Acarus*, *Glycyphagus*, *Dermatophagoides*) peuvent aussi provoquer une dermatite de contact (par ex. : les gales des boulangers ou des épiciers) mais il s'agit d'infestations transitoires. Certains acariens des nids d'oiseaux (*Hypoderatidae*) présentent un stade nymphal parasitaire (hypopus) qui vit de manière caractéristique sous la peau de l'oiseau hôte (par ex. *Hypodectes propus* chez le pigeon domestique) et provoque des irrégularités cutanées. La pédiculose ou certaines maladies fongiques, comme la teigne, peuvent entraîner une dermatite croûteuse ; de même, certaines plantes toxiques (par action physique [par ex. barbe, poils urticants] ou chimique [par ex. urushiol]) peuvent causer des réactions cutanées que l'on peut confondre avec la gale.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Le diagnostic, chez les animaux domestiques, est basé sur des données symptomatologiques et sur la mise en évidence des parasites ou de leurs stades évolutifs dans le produit de raclage de la peau des hôtes (16). Cliniquement, elle est caractérisée par une chute des poils, des lésions cutanées squameuses ou croûteuses, une dermatite, un épaissement de la peau et du prurit.

1. Détection des parasites

La chute des poils et les lésions cutanées squameuses ou croûteuses sont les signes cliniques les plus évidents. Un certain nombre d'autres troubles doivent être distingués lorsqu'une gale est suspectée, comme les maladies fongiques, les piqûres d'insectes, les plantes urticantes, les abrasions mécaniques, etc. Dans la plupart des cas, les prélèvements par raclage doivent être effectués sur les bords des lésions apparemment prurigineuses et de celles recouvertes de squames épaisses ou croûteuses. Il convient de tenir la lame du scalpel ou tout autre instrument équivalent perpendiculairement à la peau et de gratter. Pour les acariens qui s'enfouissent dans la peau, le grattage doit aller jusqu'à la rosée sanguine. Une goutte d'huile (par ex. de glycérine) peut être déposée sur la lame du scalpel afin de faciliter le prélèvement. Les échantillons de peau doivent être placés dans des récipients hermétiques (par ex. des pots propre et vide ou des tubes en plastique ou en verre avec un bouchon, ou encore des sacs en plastique étanches) puis envoyés rapidement au laboratoire pour examen. L'usage d'un aspirateur additionné d'un filtre s'est révélé plus efficace que le grattage pour les prélèvements à la surface de la peau ou des poils (17). Le matériel récolté sur le filtre est examiné comme un échantillon après raclage. Si on suspecte une otacariose, un otoscope peut se révéler nécessaire pour observer les acariens vivants dans le canal auriculaire externe. Dans ce cas, le prélèvement peut être réalisé par introduction d'un écouvillon dans le canal auriculaire externe. Il doit être examiné de la même manière qu'un prélèvement de peau.

Un examen initial de l'échantillon de peau doit être réalisé à l'aide d'une loupe de dissection. Les acariens visibles (en particulier ceux qui sont vivants et mobiles) peuvent être récupérés à l'aide d'une aiguille et déposés dans de la glycérine ou un milieu approprié sur une lame porte-objet. Quand un nombre suffisant d'acariens est obtenu, il convient de placer une lamelle couvre-objet sur la goutte de milieu en évitant la formation de bulles. Les milieux appropriés pour observer les parasites sont : le milieu de Hoyer, le liquide de Berlese, le liquide de Vitzhum et le milieu PVA modifié de Heinze. Si l'on désire des montages permanents, il convient de laisser sécher les lames pendant au moins une semaine à température ambiante puis de luter la lamelle avec du vernis à ongle ou tout autre produit de lutage.

Les acariens qui sont enfouis dans de l'exsudat ou les sécrétions lipidiques cutanées, les Demodex, par exemple, peuvent être mis en évidence en plaçant une petite quantité de produit de raclage sur une lame dans une goutte de glycérine ou d'huile à immersion et écrasant doucement avec une lamelle posée dessus. La lame peut alors être examinée directement au microscope composé.

Les prélèvements de peau contenant des acariens morts, de grandes quantités de squames, de croûtes ou de poils doivent être traités avant examen. Placer le produit de grattage de peau (jusqu'à plusieurs grammes de peau et de poils) dans une coupelle de taille adéquate et immerger l'échantillon dans une quantité suffisante de potasse à 10 %. Porter doucement à ébullition en agitant fréquemment (un agitateur magnétique avec plaque chauffante est très pratique) pendant 5 à 10 min ou plus longtemps jusqu'à digestion de la plupart des poils et de la peau. Cette étape

doit être effectuée sous une hotte à extraction pour réduire les risques d'exposition aux vapeurs toxiques. Ne pas faire bouillir trop longtemps car un temps d'ébullition prolongée risque d'entraîner la lyse des acariens. Après refroidissement, le matériel est transféré dans des tubes et centrifugé à 600 *g* pendant 10 min. Après décantation, le culot est remis en suspension dans une petite quantité de milieu de flottation (par ex. : une solution de Shealther ou un mélange à parties égales de sirop de maïs et d'eau) ; remplir le tube avec du milieu de flottation et placer une lamelle sur l'ouverture du tube en vérifiant qu'elle est en contact avec le liquide de flottation. Laisser sans remuer pendant 1 h ou centrifuger pendant 10 min. Retirer délicatement la lamelle en la soulevant verticalement afin qu'une goutte de liquide reste à la surface inférieure de la lamelle et la placer sur une lame porte-objet. Les acariens présents dans l'échantillon seront remontés à la surface et seront retrouvés dans la goutte de liquide. Une autre technique, plus simple mais satisfaisante, est utilisée dans de nombreux laboratoires ; elle consiste à remettre le culot de centrifugation en suspension dans une petite quantité d'eau distillée, de déposer une goutte sur une grande lame porte-objet (76 × 51 × 1 mm) et de recouvrir avec une lamelle de 40 × 50 mm. Cette lame est examinée à la loupe à dissection (×40 ou ×100) avec retro-éclairage. La lame peut par la suite être examinée au microscope composé pour la recherche des acariens.

L'ADN de *Sarcoptes scabiei* a été détecté avec succès par amplification en chaîne par polymérase (PCR) à partir de squames cutanées humains (5). Cette technique est prometteuse comme procédure complémentaire pour la détection spécifique d'acariens difficiles à mettre en évidence dans des produits de grattage cutanés.

Quand les acariens sont difficiles à mettre en évidence dans les produits de grattage de petits animaux de compagnie, il est possible de recourir à la flottation fécale.

2. Identification des parasites

Les acariens responsables des gales sont, en général, de très petits acariens (100 à 190 µm), peu chitinisés, se déplaçant lentement et vivant en permanence sur leur hôte. Le cycle des acariens responsables de gales est court (de 1 à 5 semaines) et comprend 4 stades : l'œuf, une larve hexapode, une ou plusieurs nymphes octopode(s), et un adulte à 8 pattes (mâle et femelle). Pour identifier correctement les agents responsables des gales, il convient de consulter les clés de diagnostic illustrées (par ex. : 3, 13, 15, 16, 18, 40), les descriptions taxonomiques et les spécimens de référence. Cependant, certaines caractéristiques de diagnostic de chacun des groupes d'acariens sont soulignées dans les paragraphes suivants.

La gale est le résultat chez les animaux domestiques des réactions physiologiques, immunologiques et comportementales des hôtes à une infestation par des acariens d'une des 11 familles d'Astigmata ou des 5 familles de Prostigmata.

a) Astigmata

Les Astigmata sont, en général, de petits acariens globuleux ou ovales et à cuticule mince. La cuticule somatique présente souvent de fines stries parallèles (profil caractéristique), avec des soies, des denticules, des épines ou des écailles aux formes et aux emplacements clairement visibles, et parfois des écussons peu chitinisés. Les adultes possèdent en général 8 pattes et des pièces buccales comprenant des paires de palpes et des chélicères adaptées au percement de la peau et à l'alimentation. Les pattes sont courtes et fixées près du corps par des épimères cuticulaires (apodèmes coxaux) et se terminent par une grande variété de formes de soies ou par des griffes empodiales au niveau pré-tarsal ou par des ventouses ambulacraires. Les acariens Astigmata ne possèdent pas de vraies paires de griffes pré-tarsales. Les mâles portent parfois des ventouses somatiques ou d'autres caractères sexuels secondaires qui servent lors de l'accouplement, mais la forme et la position des soies et des ventouses ambulacraires sur les pattes sont suffisamment différentes pour distinguer les sexes ou identifier les différentes espèces d'acariens. Les œufs fertilisés sont simples, mous, ovoïdes et translucides. Ils sont éliminés, par les femelles après l'accouplement par un ovipore positionné au milieu du ventre.

i) Sarcoptidae

Tous les acariens sarcoptidés (sarcoptiformes) sont des parasites obligatoires, créant des sillons dans la peau des mammifères et dont on a décrit plus de 100 espèces (18). Sous des conditions relativement favorables, leur survie en dehors d'un hôte est limitée à 10 jours voire moins (1). Du fait de leur installation dans les couches de l'épiderme, la gale due à ces acariens est, en général, plus sérieuse que celle due aux acariens vivant à la surface de la peau. Ce sont des acariens globuleux, à face ventrale aplatie et à cuticule finement striée. Les palpes ne comprennent qu'un segment et les pattes sont, en général, courtes. Trois genres sont importants en médecine vétérinaire pour les animaux domestiques.

Sarcoptes scabiei

L'acarien *Sarcoptes scabiei* est l'agent de la gale sarcoptique, chez l'homme et chez d'autres mammifères (1). Il s'agit d'un des agents de gale les plus fréquents et largement répandus provoquant une maladie grave. Il affecte plus d'une centaine d'espèces hôtes incluses dans au moins 10 ordres de mammifères et 26 familles (6).

Parmi les hôtes domestiques, on note les chameaux, les bovins, les chiens, les moutons, les chèvres, les chevaux, les porcs, les lamas et les alpagas. Fain (11) suggère que les humains étaient les hôtes originels de *Sarcoptes* et que toutes les autres espèces n'ont été qu'infectées en deuxième lieu. En dépit de quelques réserves (19), un consensus scientifique s'est établi sur la base de l'hypothèse de Fain (11) qui estime que les *Sarcoptes* parasites de toutes les espèces ne sont que des variants d'une seule espèce. La transmission entre individus de la même espèce ou d'un genre se fait aisément lors d'un contact étroit, mais les hôtes qui ne sont pas apparentés au plan taxonomique ne s'infestent pas facilement et les infestations guérissent d'elles mêmes. *S. scabiei* var. *canis*, par exemple, passe facilement de chien à chien et peut être transmis au renard, au coyote et autres canidés (31), mais pour ce variant les humains ne sont que des hôtes transitoires (9). Des analyses moléculaires récentes appuient l'hypothèse de l'appartenance à la même espèce de tous les variants de *Sarcoptes* (42) ; une réponse immunitaire a été mise en évidence chez les hôtes infestés par *Sarcoptes* (2).

Les femelles adultes de *S. scabiei* ont une longueur d'environ 500 µm avec une cuticule striée (profil caractéristique), des pattes courtes et épaisses, des soies et des épines caractéristiques, et une plaque dorsale de denticules. Les mâles sont semblables mais plus petits (environ 275 µm) et les denticules sont plus petites et moins nombreuses. L'anus est en position postérieure dans les deux sexes, et les épimères (apodèmes) de la première paire de pattes sont fusionnées pour former un « Y ». On observe des ventouses pédunculées, non jointives, sur les pattes I et II dans les deux sexes et sur les pattes IV chez les mâles. Les autres pattes se terminent par une soie filiforme. En outre, à l'extrémité de chaque tarse on trouve une ou deux soies en forme de courts éperons. Les nymphes sont semblables aux femelles, mais de plus petite taille et dépourvues d'ovipore ; les larves sont semblables mais sont plus petites et n'ont que 3 paires de pattes.

Trixacarus caviae

Cet acarien est un parasite spécifique du cobaye en captivité et au laboratoire, *Cavia porcellus*, et il n'a jamais été retrouvé chez les animaux en liberté (18). Bien que ces acariens soient plus petits, sa morphologie et son cycle biologique sont semblables à ceux de *S. scabiei*. Cependant, toutes les soies sur le dos de *T. caviae* sont en forme de longs poils, à la différence de ceux de *Sarcoptes*, qui sont courtes et épaisses ou en forme d'épine ; les mâles de *Trixacarus* n'ont pas de ventouses pré-tarsales sur la 4^e paire de patte et les pédoncules de toutes les ventouses sont un peu plus petits que ceux des *Sarcoptes* typiques. Cet acarien peut entraîner une gale grave chez la plupart des hôtes, notamment dans les animaleries de laboratoire. Un acarien semblable peut infester les rats de laboratoire, mais cette affection est rare.

Notoedres spp.

Le genre *Notoedres* est large et comprend quelques 40 espèces, dont la plupart sont associées aux chauves-souris (chéroptères) (18). Quatre espèces posent problème en provoquant la gale notoédrique chez les animaux domestiques. L'acarien de la gale du chat, *Notoedres cati*, est un parasite cosmopolite du chat domestique mais il infeste aussi plusieurs félinidés sauvages (par ex., lynx, guépard, serval, léopard des neiges), ainsi que la civette, le coatimundis, la mangouste et le lapin domestique. Ces acariens sont très contagieux et déterminent une gale très prurigineuse, notamment au niveau de la tête de l'hôte s'étendant parfois sur les pattes, la région génitale ou même la queue. Les rats de laboratoire sont atteints par *N. muris* qui creusent des galeries dans le *stratum corneum* de l'épiderme et entraînent un épaississement et une kératinisation de la peau au niveau du pavillon de l'oreille, des paupières, du nez et de la queue. Les rats, *Rattus* spp., plusieurs autres rongeurs, deux marsupiaux et le hérisson sont d'autres hôtes potentiels (18). La souris de laboratoire peut être infestée par deux espèces de *Notoedres*, *N. musculi* et *N. pseudomuris*, mais cette dernière touche en premier lieu les populations sauvages de souris. Chacun de ces acariens infeste aussi d'autres espèces de rongeurs murins. La maladie est semblable à la gale du rat due à *N. muris*. Les acariens *Notoedres* sont, en général, semblables aux acariens *Sarcoptes* mais 2 fois plus petits, et ils ne possèdent pas de plaque dorsale recouverte de denticules et de soies en forme d'épines, qui sont parfois remplacés par des écailles provenant de la segmentation des stries linéaires dorsales et des soies courtes. L'anus est en position postéro-dorsale, la premières paires d'épimères ne sont fusionnés et les tarses des pattes I et II se terminent par 3 ou 4 soies en forme d'éperons courts, et non seulement deux.

ii) Psoroptidae

Les acariens de la famille des *Psoroptidae* sont des parasites obligatoires des mammifères. Ils habitent et se nourrissent à la surface de la peau de l'hôte (non fouisseuses). Leur survie en dehors d'un hôte peut aller jusqu'à 2 semaines voir plus (27). Ils sont, en général, ovoïdes, aplatis dorso-ventralement, avec une cuticule striée et des soies dispersées dessus (mais pas d'épines) ; leurs pattes sont plus longues et leurs pièces buccales plus proéminentes que celles des acariens *Sarcoptidae*. L'anus est en position postéro-ventrale. Les mâles possèdent une paire de lobes postérieurs et 2 ventouses adanales proéminentes, qui s'unissent aux tubercules copulateurs de la femelle. Les épimères de la première paire de pattes ne sont pas fusionnés. Plus de 30 genres d'acariens *Psoroptidae* sont répertoriés qui affectent au moins 7 ordres de mammifères ; la plupart se retrouve chez les primates (26). Trois genres sont importants en médecine vétérinaire pour les animaux domestiques.

Psoroptes ovis

Pendant les décennies qui ont suivi les travaux de Sweatman (36), l'usage chez les acarologues était de distinguer plusieurs espèces de *Psoroptes* parmi les acariens responsables, dans le monde entier, de la gale psoroptique chez les ongulés domestiques ou sauvages et les lapins : par ex. *P. cuniculi* dans les oreilles des lapins et de divers ongulés, *P. equi* sur le corps des chevaux, *P. ovis* sur le corps des moutons et d'autres ongulés. La distinction faite entre espèces était basée à l'origine sur l'hôte, sur les régions du corps infestées et sur la morphologie des mâles. Récemment, plusieurs auteurs ont invalidé ces critères en utilisant des analyses génétiques pour démontrer l'appartenance à une seule espèce des différentes espèces traditionnellement décrites (4, 29, 41, 43). *P. ovis* est le premier *Psoroptes* dont la description a été publiée (37), ce qui en fait la dénomination officielle de tous les acariens quelque soit l'espèce animale hôte. La nomenclature des *Psoroptes* est donc semblable à celle des *Sarcoptes*, avec une seule espèce variable aux plans morphologique et génotypique qui sévit dans le monde entier, quoique le spectre d'hôtes soit moins large et une spécificité d'hôte moins stricte chez les variants. Tant chez les moutons que chez les bovins, la gravité de la gale psoroptique semble varier en gravité selon le variant de *P. ovis* en cause, la forme la plus sévère étant une maladie due à un génotype particulièrement pathogène et connue sous le nom de « sheep scab ». Cette forme a été éradiquée aux États-Unis d'Amérique, en Nouvelle Zélande, au Canada et en Australie, mais elle persiste dans de nombreuses régions du monde. L'analyse génotypique des acariens en cause sera donc un outil précieux pour les futurs programmes d'éradication (12).

Les femelles adultes de *Psoroptes* mesurent entre 550 et 750 µm de longueur et possèdent une cuticule striée ainsi que 4 soies longues et 16 soies dorsale (32, 36). Un écusson cuticulaire antéro-dorsal remarquable est présent derrière les pièces buccales et l'ovipore situé au milieu du ventre a une forme de U renversé. La taille des mâles n'atteint que les ¾ de celle des femelles ; ils possèdent un écusson cuticulaire postéro-dorsal supplémentaire plus grand, une paire de ventouses copulatrices et 2 lobes opisthosomaux terminaux présentant chacun 4 soies de tailles et de structures différentes. Les nymphes et les larves sont semblables aux adultes quoique plus petites ; tous les *Psoroptes* ont une coloration blanche. À tous les stades évolutifs, les deux pattes antérieures sont plus épaisses et plus robustes que les paires postérieures qui sont plus minces et, chez les mâles la 4^e paire est plus courte. Les pattes I et II dans les deux sexes se terminent par des ventouses infundibuliformes portées par un pédicule triarticulé ; les pattes IV des femelles et les pattes III des mâles ont des structures semblables. Le 3^e tarse des femelles se terminent par 2 longues soies en forme de fouet, tandis que les mâles possèdent une seule soie courte sur le tarse IV ainsi qu'une soie fine associée à une ventouse infundibuliforme sur le tarse III.

***Chorioptes* spp.**

Actuellement, le genre comprend 5 espèces putatives d'ectoparasites obligatoires qui entraînent la gale chorioptique chez des mammifères domestiques et sauvages. Trois de ces espèces – récoltées rarement sur des animaux sauvages – sont peu connues et pourraient ne pas être d'authentiques espèces, mais *C. bovis* et *C. texanus* – récoltées essentiellement à partir d'animaux domestiques – ont fait l'objet d'études approfondies avec les techniques modernes de biogénétique et sont reconnues comme des espèces (8, 44). Au sein de ces espèces, un certain nombre de variants spécifiques d'hôtes ne peuvent pas être distingués les uns des autres (35). Les deux espèces sont distinguables morphologiquement seulement par les différences observées au niveau des lobes postérieurs terminaux et des soies chez les mâles (35). La gale chorioptique, aussi appelée « barn itch » en anglais, pourrait être la gale la plus fréquente chez les chevaux et les bovins. Il s'agit d'une forme relativement bénigne qui est plus localisée et moins prurigineuse que les gales psoroptique ou sarcoptique. Ceci est vraisemblablement dû au fait que les *Chorioptes* sont capables de vivre à la surface de la peau en se nourrissant de débris épidermiques, sans attaquer forcément les couches vivantes de la peau de l'hôte. Les infestations tendent à se localiser sur les parties basses de l'hôte, en particulier les pattes et les pieds mais aussi la mamelle ou le scrotum, la base de la queue et le périnée. Parfois, *C. texanus* infeste les oreilles de l'hôte (35). *Chorioptes bovis* est connu depuis plus de 160 ans et sévit très largement chez les bovins, les chèvres, les moutons, les camélidés et peut-être aussi les lapins domestiques. *Chorioptes texanus* n'a été découvert qu'en 1924, mais pendant 50 ans il n'a été récolté que chez des chèvres et des bovins aux États-Unis et au Canada (35). Depuis 1975, il a été retrouvé chez des élans européens (*Alces alces*) et, à plusieurs reprises, chez des bovins au Brésil, en Allemagne, en Israël et aux États-Unis (10, 30, 44). Sur la base d'observations non publiées par l'USDA, *C. texanus* pourrait être maintenant l'espèce majoritaire de *Chorioptes* dans le bétail aux États-Unis d'Amérique.

Chez les animaux domestiques, les deux espèces de *Chorioptes* sont pratiquement identiques quel que soit le stade de développement. Le corps est arrondi et aplati avec une cuticule striée ; la taille des femelles est d'environ 400 µm et les mâles sont plus petits (3/4 des femelles) ; les larves et les nymphes sont encore plus petites. Dorsalement, les adultes des deux sexes possèdent des écussons cuticulaires antérieurs et postérieurs et une grande variété de petites soies courtes. Sur la face ventrale, l'ovipore des femelles est une fente transversale avec une paire d'apodèmes latéraux. Les pièces buccales n'ont rien de remarquable ; les pattes sont moyennement longues et robustes, à l'exception de la quatrième paire des mâles qui est très courte, et des troisième et quatrième paires des femelles qui sont plus fines. Dans les deux sexes, toutes les pattes se terminent par des ventouses infundibuliformes au bout de pédoncules courts à l'exception de la troisième paire

qui chez les femelles se termine par 2 longues soies filiformes. Les mâles aussi possèdent une longue soie filiforme sur chacune des 3^e pattes ainsi qu'une paire de ventouses adanales. Les lobes opisthosomaux portent 5 soies chacun. Les lobes opisthosomaux de *C. bovis* ont une forme rectangulaire, et une soie longue et flagellée à l'angle externe ; les 2 soies spatulées sont larges et relativement plus courtes (environ 115 µm). Les lobes de *C. texanus* ont une forme sub-triangulaire, presque bilobée, avec une soie très courte à l'angle externe et 2 soies spatulées plus longues (environ 215 µm) qui semblent soudées à la base.

Otodectes cynotis

Les carnivores sont les hôtes essentiels de ces acariens très contagieux qui infestent principalement les conduits auditifs de l'hôte mais peuvent parfois s'étendre jusqu'au pavillon de l'oreille, voire au-delà. Les signes cliniques de la gale otodectique (otacariose) comprennent le frottement et le grattage des oreilles, de violentes secousses de la tête, de la dépression, un écoulement excessif et des hématomes au niveau de l'oreille. L'otacariose est vraisemblablement la plus fréquente des gales des carnivores dans le monde entier, tant les carnivores domestiques que sauvages. En plus des animaux de compagnie (chiens, chats, furet), l'otacariose peut aussi affecter plusieurs espèces élevées pour leur fourrure (renard, vison), et peut à l'occasion passer à l'homme. Comme pour les autres acariens responsables de gales, les auteurs ont dans le passé considéré que les *Otodectes* retrouvés dans des régions différentes ou sur des hôtes différents appartenaient à des variétés distinctes voire à des espèces différentes, mais les études récentes phénotypiques et moléculaires ont conclu à l'unicité du genre (21).

Les *Otodectes* ont la morphologie typique des *Psoroptidae* et un cycle évolutif qui ressemble à celui de *P. ovis*. Le corps des femelles a une forme ovale et une taille de 435 µm ; celui des mâles est de 325 µm. L'ovipore des femelles se présente sous la forme d'une fente transversale avec des apodèmes génitaux latéraux et, de chaque côté, les épimères des pattes I et II sont fusionnés. Les lobes opisthosomaux sont moins individualisés mais les ventouses copulatrices sont présentes. Chaque lobe porte 5 soies de tailles différentes. Toutes les pattes sont robustes et moyennement longues, à l'exception de la 4^e paire qui est plus courte notamment chez les femelles. Des ventouses ambulacraires portées par de très courts pédicules sont présentes à l'extrémité de toutes les pattes sauf, chez les femelles, pour les deux paires de pattes postérieures terminées par une paire de longues soies. Le troisième tarse des mâles portent aussi une paire de longues soies en plus des ventouses ambulacraires.

iii) *Knemidokoptidae*

Cette famille comprend 7 genres et environ deux douzaines d'espèces d'acariens qui vivent chez les oiseaux dans les mêmes habitats que ceux occupés par les *Sarcoptidae* chez les mammifères (26). Par voie de conséquence et vraisemblablement du fait d'un phénomène de convergence, les morphologies des deux groupes sont semblables. Le corps est généralement globuleux, avec des striations cuticulaires parfois modifiées pour donner des écailles, des sillons ou des denticules. Les pièces buccales et les pattes sont habituellement courtes et trapues. Les ventouses pré-tarsales peuvent être présentes, incomplètes ou absentes sur toutes les pattes, et les tarsi peuvent se terminer par un ou deux éperons chitineux. Les soies sont généralement peu nombreuses, non différenciées et relativement courtes. Les *Knemidokoptidae* ont un écusson antéro-dorsal marqué par une paire d'apodèmes longitudinaux para-médians et très chitinisés qui partent de la base des pièces buccales. Les mâles (mais pas les femelles) possèdent aussi un écusson postéro-dorsal médian et les épimères de la première paire de pattes sont fusionnés pour former un Y. Les premiers épimères des femelles (et des immatures) sont soit libres soit réunis par un apodème transversal pour former un V ou un U. L'ovipore se présente soit comme une fente transversale soit comme une structure à 3 valvules en forme de Y ; l'anus est terminal ou postéro-dorsal. Les mâles peuvent posséder ou non des ventouses adanales. La plupart des espèces sévissent, au niveau mondial pour certaines, seulement chez les oiseaux sauvages chez qui elles provoquent une gale knémidocoptique clinique ; néanmoins, chez les oiseaux domestiques ou en captivité, seules les espèces classées dans 3 genres posent un problème.

Knemidokoptes mutans s'enfouit le plus souvent dans l'épiderme des pattes des volailles, poules, dindes et faisans (déterminant les « pattes écailleuses »). En l'absence de traitement, une boiterie, une distorsion des pattes et une perte des doigts peuvent survenir. Les épimères des premières pattes des femelles sont libres ; les pattes I et II ont chacune 2 éperons terminaux, mais il n'existe pas de ventouse ambulacraire sur aucune patte ; l'ovipore est transversal ; l'anus est en position dorsale ; et le corps présente un dessin d'écailles cuticulaires au milieu du dos. Les femelles mesurent de 350 à 450 µm et les mâles ont une taille inférieure à 240 µm. Comme pour tous les acariens de la famille des *Knemidokoptidae*, les pattes des mâles sont plus longues que celles des femelles et se terminent toutes par une petite ventouse à l'extrémité d'un long pédicule. Une autre espèce semblable, *K. pilae*, parasite la tête et les pattes des perruches provoquant une maladie connue sous le nom de « face écailleuse » des oiseaux de volière. Ces acariens sont légèrement plus petits que *K. mutans*. Les deux espèces sont vraisemblablement réparties dans le monde entier, chacune sur ses hôtes respectifs.

Picinemidicoptes laevis infeste les oiseaux de l'ordre des colomiformes, comme le pigeon domestique, entraînant parfois une gale clinique. Chez les femelles, les épimères des premières pattes sont fusionnés pour

former un U ; chaque patte possède un seul pédoncule ambulacraire et les pattes I et II se terminent par un éperon ; l'ovipore est transversal ; l'anus est terminal ; les stries cuticulaires ne sont pas interrompues par des écailles.

Neocnemidocoptes gallinae peut infester la peau du dos, de la tête, du cou, de l'abdomen et les cuisses des poulets, des oies et des faisans en provoquant un prurit intense. Les plumes de ces régions peuvent tomber, se casser ou être picorées par l'oiseau conduisant à un état appelé « gale déplumante ». La peau atteinte surtout celle du cou, peut devenir écaillée, épaissie et ridée. Bien que la « gale déplumante » soit moins largement répartie que « les pattes écaillée », elle peut causer plus de dommages et même se révéler fatale. Les femelles mesurent de 340 à 440 µm de long, mais les mâles n'atteignent que 210 µm. Les épimères des premières pattes des femelles *Neocnemidocoptes gallinae* sont libres ; les tarses se terminent par un seul pédoncule ambulacraire et les deux paires de pattes antérieures se terminent par un éperon ; l'ovipore est transversal ; l'anus est dorsal ; et la cuticule dorsale est striée transversalement mais sans écailles. Deux autres espèces de *Neocnemidocoptes*, *N. columbicola* et *N. columbigallinae*, infestent les colombiformes à l'occasion et peuvent entraîner des lésions chez les pigeons domestiques.

iv) Autres familles

Huit autres familles d'acariens parasites des plumes et de la fourrure comprennent un certain nombre d'acariens de moindre importance en raison de leur gamme limitée d'hôtes ou des symptômes bénins qu'ils causent chez leurs hôtes.

Trois familles méritent d'être citées. La famille des *Atopomelidae* comprend près de 50 genres d'acariens du pelage dont les hôtes se répartissent dans 5 ordres de mammifères, surtout les marsupiaux de l'hémisphère sud. Le corps est de forme variable mais la plupart sont mous, légèrement allongés, aplatis ou cylindriques et les pattes possèdent des segments aplatis pour accrocher les poils de l'hôte à la face ventrale de l'acarien qui est souvent munie de sillons au niveau des coxa des pattes I et II. *Chirodiscoides caviae* est rencontré sur les cobayes et est vraisemblablement présent dans le monde entier, mais il a été couramment signalé en Asie et en Europe où il provoque un sérieux prurit et de l'alopécie chez les animaux de laboratoire. La famille des *Listrophoridae* est une autre famille d'acariens du pelage et comprend environ 20 genres retrouvés sur des animaux de 4 ordres de mammifères, en particulier des rongeurs et surtout dans l'hémisphère nord. Ces acariens sont mous, allongés, cylindriques avec des stries cuticulaires, des épines, des écussons ponctués, ainsi qu'un tégument dorsal chitinisé qui recouvre les pièces buccales. Ils s'accrochent à la base des poils par le biais d'une paire de crêtes situées entre la première paire de pattes et rabattues ventralement. *Lepoacarus gibbus* est un acarien fréquent qui provoque parfois une gale chez les lapins d'élevage ou de laboratoire, et *Lynxacarus radovskyi* est retrouvé sur plusieurs félins sauvages et sur le chat domestique chez qui il entraîne parfois des dartres ou des pellicules. La famille des *Myocoptidae* est une famille cosmopolite ; elle comprend 6 genres qui se nourrissent sur la peau et s'agrippent aux poils chez les rongeurs, les insectivores et les marsupiaux. Ces acariens sont généralement de forme ovale et aplatis dorso-ventralement. La cuticule peut être largement striée, couverte d'écailles ou denticulées chez les femelles, alors que chez les mâles les cuticules sont moins ornées et plus fortement chitinisées. Ils s'accrochent aux poils des hôtes par le biais de pattes très modifiées et robustes : les pattes III et IV chez les femelles et les pattes III chez les mâles. *Myocoptes musculus* est probablement le plus ubiquiste des ectoparasites des souris de laboratoire. Les infestations sont habituellement bénignes, mais si les souris sont stressées ou vivent dans de mauvaises conditions, on peut observer de l'alopécie, un érythème, du prurit et une dermatite traumatique (gale myocoptique). Un autre acarien de la famille des *Myocoptidae*, *Trichoecius romboutsii*, peut à l'occasion parasiter les souris de laboratoire en association avec *M. musculus* ou d'autres acariens, mais son rôle pathogène dans l'apparition de gale n'est pas certain.

Cinq familles d'acariens retrouvés sur la peau ou dans les plumes des oiseaux méritent d'être signalées. Elles sont classées parmi les 36 familles d'acariens Astigmata et dans 3 super-familles habituellement appelées « acariens des plumes » (13). Des milliers d'espèces d'acariens des plumes vivent sur ou dans la peau ou les plumes de pratiquement toutes les sortes d'oiseaux dans le monde, avec généralement un statut de commensaux. Rarement et dans des circonstances inexplicables, ces acariens commensaux chez pratiquement tous les genres d'oiseaux peuvent se révéler des parasites avec des conséquences graves pour l'hôte. Les membres de certaines familles (par ex. *Cytoditidae*, *Laminosioptidae*) sont devenus d'authentiques parasites associés à des entités nosologiques y compris des gales (par ex. *Knemidokoptidae*). Quelques espèces appartenant à d'autres familles sont plus enclines que d'autres à affaiblir les hôtes ou entraîner des blessures. Ainsi, dans la famille *Analidae*, les espèces *Megrinia cubitalis*, *M. ortari*, *M. hologastra* et *M. ginglymura* peuvent entraîner chez le poulet domestique des comportements menant à la chute des plumes et à des pertes économiques (14). *Dermoglyphus elongatus* (famille *Dermoglyphidae*) sévit chez les canaris en captivité, et *Dubinina melopsittaci* (famille *Xolalgidae*) sévit chez les perruches et une présence excessive de ces acariens peut engendrer une chute des plumes associée à des lésions cutanées. Les membres des familles *Dermationidae* et *Epidermoptidae* se nourrissent généralement sur la peau ou dans les follicules plumeux de certains oiseaux, ce qui leur confère une position proche de l'état de parasites. Les volailles domestiques sont des hôtes pour *Rivoltasia bifurcata* et *Epidermoptes bilobatus* (appartenant aux deux espèces ci-dessus) qui ont été occasionnellement associées à du pityriasis (gale épidermoptique) chez les poulets (3).

b) Prostigmata

Avec près de 15 000 espèces reconnues regroupées dans plus de 130 familles, les acariens Prostigmata constituent un groupe qui présente une très grande diversité morphologique et biologique rendant difficile toute généralisation à leur sujet. Cependant tous les acariens Prostigmata responsables de gales appartiennent à la super-famille Cheyletoidea qui comprend seulement 1 000 espèces reconnues classées dans 9 familles. Il existe aussi des centaines d'espèces non décrites. Les pièces buccales antérieures de ces acariens peuvent être modifiées de façon très variable soit par la formation de segments de palpe soit par la réduction et la fusion des chélicères avec élongation pour constituer des stylets pointus utilisés pour percer les tissus de l'hôte en vue de prélever les aliments. Certains acariens Cheyletoidea possèdent une paire de périrèmes respiratoires allongés, en position dorsale, au dessus des pièces buccales. Le corps est généralement allongé (parfois très allongé), mou, recouvert d'un tégument fin, mais avec parfois des plaques chitineuses. Les adultes possèdent habituellement 8 pattes dont la longueur et la forme varient selon les comportements des différentes familles, mais qui se terminent en général par une paire de pinces pré-tarsales et une zone empodiale linéaire souvent recouverte de nombreux poils collants. Les pattes peuvent être articulées sur 2 plaques coxales ou des apodèmes somatiques chitinisés. L'ovipore est longitudinal habituellement eu milieu du ventre ou en position postéro-ventrale, tandis que le pore génital des mâles est en position dorsale et est parfois équipé d'un long aedeagus.

i) Demodecidae

La famille des *Demodecidae* comprend plus de 150 espèces d'acariens parasites regroupés dans 7 genres et retrouvés chez 11 ordres de mammifères. *Demodex* est le seul genre important chez les animaux domestiques et comprend au moins 67 espèces reconnues plus beaucoup d'autres ni nommées ni décrites. D'autres genres présentent les mêmes caractéristiques ; les *Demodex* adultes sont des acariens allongés, fusiformes ou vermiformes, de 250 à 850 µm de long, qui vivent dans les follicules pileux, les glandes sébacées, les glandes de Meibomius, et parfois les pores épidermiques de l'hôte. Les pièces buccales sont courtes et en position antérieure avec 2 palpes segmentés et des stylets très pointus rétractables qui servent à percer les tissus de l'hôte et à prélever comme aliments les fluides cellulaires prédigérés. Les 4 paires de pattes sont habituellement courtes et trapues, composées de 3 segments chacune et qui se terminent par des griffes pré-tarsales et un empodium linéaire. Les plaques coxales sur lesquelles sont attachées les pattes, occupent la majeure partie de la surface antéro-ventrale du corps. Dans certaines espèces et à certains stades, les palpes ou une paire de pattes peuvent être très allongées ou modifiées pour former des organes de préhension. La cuticule très fine du corps et des appendices est dépourvue de soies mais les lobes opisthosomaux sont en général striés transversalement. Pour s'adapter aux étroites limites de leurs habitats folliculaires et glandulaires, les stades immatures, y compris les œufs de *Demodex* spp., sont allongés, parfois dans de grandes proportions, fusiformes ou ovoïdes. Les espèces du genre *Demodex* sont en général très spécifiques de leurs hôtes, et ne parasitent que très rarement plus d'une espèce de mammifères taxonomiquement proche. Cependant, il n'est pas rare pour une espèce hôte d'héberger de 2 à 4 différentes espèces de *Demodex*. La transmission d'un hôte à un autre ne se fait que lors d'un contact étroit (en particulier de la mère aux petits), ce qui rend très peu probable la transmission entre espèces animales ou des animaux à l'homme. Leur cuticule très fine implique que les demodex ne peuvent survivre plus de quelques heures en dehors de leurs hôtes.

Bien que les *Demodex* infestent fréquemment les peaux de tous les individus de leur espèce hôte, leur présence n'entraîne, en général, aucune conséquence remarquable. Parfois, lorsque les animaux sont soumis à des stress ou d'autres facteurs encore mal connus, les populations d'acariens explosent littéralement et peuvent entraîner des symptômes connus sous le nom de démodécie. Les animaux sains en liberté ne souffrent jamais de démodécie ; les victimes sont habituellement les animaux domestiques ou de laboratoire (25). Les symptômes vont de petites papules cutanées à des nodules volumineux et une perte de poils importante. Bien que cela soit rare, les acariens peuvent, dans les cas graves et généralisés, envahir le système sanguin ou entraîner une infection cutanée secondaire voire la mort. Chez les animaux domestiques, la maladie clinique est surtout fréquente chez les chiens (*Demodex canis* et *D. injai*), mais les porcs (*D. phylloides*), les chèvres (*D. caprae*), les chevaux (*D. caballi*), les moutons (*D. ovis*), les chats (*D. cati* et *D. gatoi*), les bovins (*D. bovis*, *D. tauri* et *D. ghanensis*) et les lapins (*D. cuniculi*) peuvent développer à l'occasion une démodécie. Les hommes sont les hôtes habituels de deux espèces, *Demodex folliculorum* et *D. brevis*.

ii) Psorergatidae

De répartition mondiale, ces petits acariens parasites de la peau sont classés dans un peu moins de 100 espèces regroupées en 3 genres (15) (considérés comme des sous-genres des *Psorergates* par certains auteurs). Les hôtes connus se répartissent dans 8 ordres de mammifères, des rongeurs et des chauves-souris pour l'essentiel. Les *Psorergatidae* adultes mesurent environ 100 à 200 µm de long, ont une forme habituellement circulaire et sont aplatis dorso-ventralement. La cuticule est mince, finement striée et un grand écusson ponctué légèrement chitinisé recouvre la plus grande partie de dos. Les pièces buccales possèdent des chélicères aiguës et 2 palpes segmentés, se terminant chacun par une soie épaisse en forme de pince. Il n'y a pas de périrèmes dorsaux. Les 4 paires de pattes sont moyennement longues, sont attachées radialement sous le ventre, comprennent 5 segments chacune et se terminent par des paires de pinces pré-tarsales, mais sans empodium. Le fémur de chaque patte porte un robuste éperon en position ventrale. Les

Psorergatidae possèdent relativement peu de soies : quelques unes sur les pièces buccales, 5 ou 6 paires sur l'écusson dorsal, 1 petite paire ventrale, 1 ou 2 longues paires sur les lobes postéro-ventraux et moins d'une dizaine sur chaque patte. Les œufs sont grands et arrondis, mesurant presque les 2/3 de la taille de la femelle adulte. Ils sont déposés dans les follicules pileux ou dans des puits creusés par la femelle. Les stades immatures ressemblent aux adultes mais en plus petits ; les pattes sont très raccourcies (seulement 6 pattes pour les larves). La transmission d'un hôte à un autre se fait directement par les adultes qui sont mobiles et qui se dirigent vers leurs zones de prédilection, à savoir les zones les moins kératinisées de la peau de l'hôte surtout autour de la tête, le cou et le dos. Ils envahissent alors les follicules pileux ou creusent des puits dans l'épiderme et se nourrissent en ponctionnant les parois cellulaires avec leurs chélicères ; ils se reproduisent ensuite. Les acariens *Psorergatidae* survivent rarement plus d'un jour en dehors de leur hôte.

Les infestations à *Psorergatidae* chez des hôtes en bonne santé et chez les animaux domestiques sont, en général, bénignes et sans conséquence. Parfois, cependant, les acariens peuvent se multiplier énormément, notamment chez les moutons et les souris de laboratoire, en entraînant une gale psorergatique. Les lésions cutanées dues aux adultes sont habituellement bénignes et relativement peu prurigineuses, mais les puits creusés dans le derme pour abriter les œufs peuvent se développer pour donner naissance à des lésions papuleuses remplies de liquide ou kératinisées, qui peuvent ensuite se rompre et causer des réactions inflammatoire ou immunitaire (25). Les acariens *Psorergatidae* provoquant des gales appartiennent à deux genres, le genre *Psorobia* (avec 4 paires de soies marginales sur l'écusson dorsal) et le genre *Psorergates* (avec 3 paires de ces soies). Les infestations par *Psorobia ovis*, responsable d'une gale du mouton, posent plus de problèmes chez les animaux âgés qui se frottent, se grattent et mordent la laine au niveau des zones irritées, ce qui donne à la toison un aspect en touffe et dépenaillé. On peut aussi observer des pellicules. Le cycle de *P. ovis* s'étale sur environ 5 semaines, l'infestation s'étendant lentement et de façon inconstante sur l'ensemble du troupeau ; l'infestation est souvent difficile à diagnostiquer. Une espèce semblable, *P. bos*, est fréquemment rencontrée chez le bétail mais elle semble n'avoir qu'un faible effet pathogène. *Psorobia cercopithecii*, présent en Afrique (ainsi qu'une espèce non décrite en Asie), peut provoquer à l'occasion une gale dans les élevages de primates de laboratoire (20). Chez les souris de laboratoire, *Psorergates simplex* peut provoquer des lésions papuleuses sur la tête et le cou (40). L'incidence peut atteindre 80 % dans certains élevages de souris. Une autre espèce du genre *Psorergates*, *P. muricola*, a été retrouvée chez 5 espèces différentes de rongeurs notamment *Mus musculus*, et *Psorergates rattus* a été observée chez *Rattus norvegicus* : on ne sait pas si l'une ou l'autre de ces espèces peut infester les rongeurs de laboratoire.

iii) Cheyletiellidae

Il s'agit d'une famille relativement petite d'acariens parasites (environ une centaine d'espèces) qui jusqu'en 1970 faisait partie de la famille des *Cheyletidae*, une famille plus grande comprenant en majeure partie des Prostigmata parasites. Les espèces sont réparties entre environ 15 genres, les 2/3 parasites de mammifères et le reste parasite des oiseaux. Plusieurs genres comprennent des espèces capables de provoquer des troubles limités chez leurs hôtes, mais seulement un petit nombre d'espèces du genre *Cheyletiella* pose problème en tant que responsables de gales chez les animaux domestiques. Les acariens du genre *Cheyletiella* mesurent de 300 à 530 µm de long, ont une forme allongée et rhomboïdale, et se distinguent par une cuticule fortement striée et 1 grand écusson dorsal chez les femelles et 2 chez les mâles. Des soies modérément longues (simples ou ramifiées) sont réparties selon un schéma caractéristique sur le corps, les pièces buccales et les pattes. Les pièces buccales sont développées, avec des stylets pointus particulièrement robustes, des palpes à 5 segments se terminant chacune par une soie incurvée en forme de griffe présentant une fine ligne de denticules sur le bord interne. Des péritremes en forme de M sont situés sur la face dorsale des pièces buccales. Les 4 paires de pattes sont longues et puissantes et se terminent par un empodium linéaire équipé de 2 rangs de poils collants. Bien que la plupart des autres acariens *Cheyletiellidae* possèdent une paire de griffes pré-tarsales sur chaque patte, celles-ci n'existent pas chez les acariens du genre *Cheyletiella*. Un petit organe sensoriel (solenidion) est visible sur le genou de la première paire de pattes et sa forme est suffisamment différente (statistiquement) pour permettre la distinction entre espèces (7). Les femelles pondent leurs œufs un à un et les fixent sur les poils de l'hôte à proximité de la peau par un réseau de fils tressés. La transmission entre hôtes se fait essentiellement par contact direct mais le transport par des insectes serait aussi possible.

Pendant des années, les diverses espèces de *Cheyletiella* spp. ayant un pouvoir pathogène ont été confondues sous la dénomination unique de *C. parasitivorax* (33), et ces acariens étaient considérés à tort comme des prédateurs des autres acariens parasites. Cependant, *C. yasguri* (chez les chiens), *C. blakei* (chez les chats) et *C. parasitivorax* (chez les lapins domestiques) sont maintenant reconnues comme des espèces distinctes responsables de gales ; chacune de ces 3 espèces peut à l'occasion infester les humains vivant en contact étroit avec des animaux atteints, en provoquant une dermatite grave, du prurit et d'autres symptômes. Les acariens se déplacent rapidement entre les poils de l'hôte sur la couche cornée de la peau ; périodiquement, ils s'attachent à l'aide des griffes des palpes et percent les cellules de l'épiderme avec leurs stylets pour se gorger de liquides prédigérés. Dans les 3 espèces hôtes, la maladie est semblable et apparaît surtout au niveau du dos, des épaules et du cou. Cependant, les symptômes sont généralement bénins et peu caractéristiques. On peut aussi observer un pelage ébouriffé, une inflammation cutanée, du prurit, de l'alopecie et presque toujours de l'hyperkératose. Les acariens à peine visibles se déplacent dans l'épaisse couche blanchâtre de pellicules associées à la cheyletielliose, ce qui a valu à cette gale le nom « pellicules baladeuses : *walking dandruff* ».

iv) **Myobiidae**

Il s'agit de petits acariens du pelage (jusqu'à 900 µm), mous, allongés, rectangulaires, un peu aplatis dorso-ventralement et retrouvés dans le monde entier sur 5 ordres de mammifères. Plus de 400 espèces ont été identifiées dont au moins la moitié chez des chauves-souris. La cuticule est généralement striée transversalement sans écussons scléreux ; ils portent habituellement au niveau du dos 12 ou 16 paires de soies dont la plupart sont longues, en forme de feuilles et striées longitudinalement. Les pièces buccales sont petites avec des palpes à 2 ou 3 segments, des chélicères en forme de stylets, et des péritriches en position dorsale. Les pattes, notamment la première paire, sont fortes et bien adaptées à la préhension des poils (1 à 2 en même temps) de l'hôte. Elles se terminent par de grandes griffes pré-tarsales mais sans empodium ; parfois une des deux griffes d'une patte est réduite ou absente. Les systèmes pour accrocher les poils de l'hôte sont caractéristiques et regroupent une variété de combinaisons de segments de pattes ou de soies modifiés pour former des éperons, des crochets, des mamelons, des arêtes ou des surfaces cannelées. Les nymphes et les larves ressemblent aux adultes à l'exception de la taille. Les œufs sont attachés par les femelles à la base des poils de l'hôte grâce à une sécrétion adhésive. Occasionnellement, les larves peuvent pénétrer dans le follicule pileux pour se nourrir des fluides de l'hôte qui s'écoulent lors de la ponction des capillaires grâce aux chélicères. Les nymphes et les adultes se nourrissent à la surface de la peau de l'hôte selon la même procédure, en ponctionnant parfois les capillaires et en se gorgeant de sang. Le cycle des *Myobiidae* est en général assez court (environ 14 jours) et les acariens se déplacent aisément d'un hôte à l'autre. Les infestations sur les mammifères sauvages sont en règle générale de faible intensité et sans conséquence (25), mais chez les rongeurs de laboratoires elles peuvent s'étendre en provoquant du prurit et une perte de poils connus sous le nom de gale myobique.

Les deux espèces *Myobia musculi* et *Radfordia affinis* sont retrouvés chez la souris sauvage ou de laboratoire et chacune de ces espèces peut entraîner des troubles sur les animaux de laboratoire. Elles sont relativement semblables mais elles diffèrent par de nombreux détails, dont les plus faciles à observer sont : le nombre de griffes pré-tarsales présentes sur la deuxième patte (2 chez *Radfordia* et 1 seule chez *Myobia*). *Radfordia ensifera* infeste les rats de Norvège et les rats de laboratoire, en entraînant parfois une gale chez ce dernier. Alors que les 2 griffes pré-tarsales de la deuxième paire de pattes sont de la même taille chez *R. ensifera*, la griffe postérieure de *R. affinis* est plus petite que la griffe antérieure.

v) **Syringophilidae**

Plus de 350 espèces de ces acariens des plumes, qui sont très spécifiques d'hôtes, ont été retrouvés chez une grande variété d'oiseaux dans le monde entier, mais très peu d'entre eux ont été décrits et ont reçu un nom. Le corps est allongé (entre 500 et 950 µm), cylindrique quand ils sont dans les plumes infestées de l'hôte. La cuticule est mince, striée, sans plaque chitineuse, mais de longues soies sont réparties sur le corps en particulier à l'extrémité postérieure. Des péritriches en forme de M sont visibles au-dessus des pièces buccales qui sont équipées de stylets et de palpes droits et simples. Les pattes sont courtes, robustes et se terminent par une paire de griffes et des empodium poilus. Des épimères sclérotinisés sont visibles sur les plaques coxales I et II. Quand ils vivent dans les hampes des plumes, les acariens *Syringophilidae* ponctionnent les parois de la plume avec leurs stylets et se nourrissent des fluides qui s'écoulent des follicules plumeux.

Deux espèces d'acariens des plumes d'oiseaux domestiques peuvent infester en grand nombre les animaux et entraîner de graves irritations ainsi qu'une importante chute de plumes que l'on peut confondre avec la gale knemidokoptique ; *Syringophilus columbae* parasite les pigeons domestiques et *S. bipectinatus* infeste les poulets. Les méthodes modernes d'élevage des poulets qui séparent les bandes de poulets des poules pondeuses ont interrompu avec succès la chaîne de transmission de *S. bipectinatus* d'une génération à la suivante et réduit ainsi les problèmes de chute des plumes, ce qui n'est pas le cas des systèmes de production traditionnels. Une autre espèce d'acariens des plumes a été récemment décrite chez les poulets (2001), *Picobia polonica*, mais n'a pas été associée pour le moment à des problèmes de chute de plumes.

3. **Épreuves sérologiques**

Des auteurs ont démontré que les infestations par *Sarcoptes scabiei* et *Psoroptes ovis* induisaient des réponses humorales spécifiques et mesurable chez les hôtes (12, 23) ; cela permet une détection sérologique des gales sarcoptique et psoroptique. Des méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) pour la détection des infestations par *Sarcoptes* chez les chiens et les porcs sont commercialisées dans certains pays et sont utilisées pour le séro-diagnostic de la gale (22) en Suède et en Suisse dans le cadre de programmes d'éradication de la gale chez le porc. Des recherches sont en cours pour développer une épreuve de diagnostic immunologique de *S. scabiei* en utilisant des antigènes recombinants (38). Des techniques ELISA pour le diagnostic sérologique des infestations à *Psoroptes* sont en cours de développement et d'évaluation, mais des problèmes de sensibilité et de spécificité n'ont pas encore été résolus. La preuve indéniable de la présence d'une gale reste la mise en évidence et l'identification des acariens par grattage de la peau ; toutefois, il est possible qu'à l'avenir cette méthode traditionnelle (directe) puisse être associée à des méthodes biochimiques améliorées (indirectes).

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'existe pas de vaccins capables de protéger les animaux contre les gales. Expérimentalement, l'injection d'un antigène de *Psoroptes ovis* a réduit la gravité de la gale. Le contrôle des gales sans utilisation d'acaricides pourrait donc devenir une solution d'avenir (24, 34).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ARLIAN L.G. (1989). Biology, host relations, and epidemiology of *Sarcoptes scabiei*. *Ann. Rev. Entomol.*, **34**, 139–161.
2. ARLIAN L.G., MORGAN M.S., VYSZENSKI-MOHER D.L. & STEMMER B.L. (1994). *Sarcoptes scabiei*: The circulating antibody response and induced immunity to scabies. *Exp. Parasitol.*, **78**, 37–50.
3. BAKER E.W., EVANS T.M., GOULD D.J., HULL W.B. & KEEGAN H.L. (1956). A Manual of Parasitic Mites of Medical and Economic Importance. National Pest Control Association, New York, New York, USA.
4. BATES P.G. (1999). Inter- and intra-specific variation within the genus *Psoroptes* (Acari: Psoroptidae). *Vet. Parasitol.*, **83**, 201–217.
5. BEZOLD G., LANGE M., SCHIENER R., PALMEDO G., SANDER C.A., KERSCHER M. & PETER R.U. (2001). Hidden scabies: diagnosis by polymerase chain reaction. *Br. J. Dermatol.*, **144**, 614–618.
6. BORNSTEIN S., MÖRNER T. & SAMUEL W.M. (2001). *Sarcoptes scabiei* and sarcoptic mange. In: Parasitic Diseases of Wild Mammals, Third Edition, Samuel W.M., Pybus M.J. & Kocan A.A., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 107–119.
7. BRONSWIJK J.E.M.H.V. & DE KREEK E.J. (1976). *Cheyletiella* (Acari: Cheyletiellidae) of dog, cat and domesticated rabbit, a review. *J. Med. Entomol.*, **13**, 315–327.
8. ESSIG A., RINDER H., GOTHE R. & ZÄHLER M. (1999). Genetic differentiation of mites of the genus *Chorioptes* (Acari: Psoroptidae). *Exp. Appl. Acarol.*, **23**, 309–318.
9. ESTES S.A., KUMMEL B. & ARLIAN L.G. (1983). Experimental canine scabies in humans. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **9**, 397–401.
10. FACCINI J.L. H. & MASSARD C.L. (1976). O gênero *Chorioptes* Gervais, 1895, parasita de ruminantes no Brasil (Psoroptidae, Acarina). *Rev. Brasil. Biol.*, **36**, 871–872.
11. FAIN A. (1968). Etude de la variabilité de *Sarcoptes scabiei* avec une revision des Sarcoptidae. *Acta Zool. Pathol. Antverp.*, **47**, 1–196.
12. FALCONI F., OCHS H. & DEPLAZES P. (2002). Serological cross-sectional survey of psoroptic sheep scab in Switzerland. *Vet. Parasitol.*, **109**, 119–127.
13. GAUD J. & ATYEO W.T. (1996). Feather mites of the world (Acarina, Astigmata): The supraspecific taxa. Part I. Text. *Ann. Mus. Roy. Afr. Cent., Sci. Zool.*, **277**, 1–193.
14. GAUD J., ROSEN S. & HADANI A. (1988). Les Acariens plumicoles du genre *Megninia* parasites des poulets domestiques. *Sci. Vét. Méd. Comp.*, **90**, 83–98.
15. GIESEN K.M.T. (1990). A review of the parasitic mite family Psorergatidae (Cheyletoidea: Prostigmata: Acari) with hypotheses on the phylogenetic relationships of species and species groups. *Zool. Verhand.* 259, 1–69.
16. KETTLE D.S. (1995). Medical and Veterinary Entomology, Second Edition. CAB International, Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK.
17. KLAYMAN E. & SCHILLHORN VAN VEEN T.W. (1981). Diagnosis of ectoparasitism. *Mod. Vet. Pract.*, **62**, 767–771.

18. KLOMPEN J.S.H. (1992). Phylogenetic relationships in the mite family Sarcoptidae (Acari: Astigmata). *Misc. Publ. Univ. Michigan, Mus. Zool.*, **180**, 1–155.
19. KUTZER E. (1970). Merkblätter über angewandte Parasitenkunde und Schädlingsbekämpfung, Merkblatt Nr 17. *Sarcoptes*-Milben und *Sarcoptes*-räude der Haustiere. Beilage zu. *Angew. Parasitol.*, **11**, 1–22.
20. LEE K. J., LANG C.M., HUGHES H.C. & HARTSHORN R.D. (1981). Psorergatic mange (Acari: Psorergatidae) of the stump-tail macaque (*Macaca arctoides*). *Lab. Anim. Sci.*, **31**, 77–79.
21. LOHSE J., RINDER H., GOTHE R. & ZÄHLER M. (2002). Validity of species status of the parasitic mite *Otodectes cynotis*. *Med. Vet. Entomol.*, **16**, 133–138.
22. LOWENSTEIN M., KAHLBACHER H. & PESCHKE R. (2004). On the substantial variation in serological responses in pigs to *Sarcoptes scabiei* var. *suis* using different commercially available indirect enzyme-linked immunosorbent assays. *Parasit. Res.*, **94**, 24–30.
23. LOWER K. S., MEDLEAU L.M., HNILICA K. & BIGLER B. (2001). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serological diagnosis of sarcoptic mange in dogs. *Vet. Dermatol.*, **12**, 315–320.
24. NESBIT A. J. & HUNTLEY J. F. (2006). Progress and opportunities in the development of vaccines against mites, fleas and myiasis-causing flies of veterinary importance. *Paras. Immunol.*, **28**, 165–172.
25. NUTTING W.B. (1985). Prostigmata – Mammalia: Validation of coevolutionary phylogenies. In: *Coevolution of Parasitic Arthropods and Mammals*, Kim K.C., ed. John Wiley & Sons, New York, New York, USA, 569–640.
26. O'CONNOR B.M. (1982). Astigmata. In: *Synopsis and Classification of Living Organisms*, Parker S.B., ed. McGraw-Hill, New York, New York, USA, 146–169.
27. OTRANTO D., MILILLO P., MESTO P., DE CAPRARIIS D., PERRUCCI S. & CAPELLI G. (2004). *Otodectes cynotis* (Acari: Psoroptidae): examination of survival off-the-host under natural and laboratory conditions. *Exp. Appl. Acarol.*, **32**, 171–179.
28. PANGUI L.J. (1994). Gales des animaux domestiques et méthodes de lutte. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **13**, 1227–1247.
29. RAMEY R.R., KELLEY S.T., BOYCE W.M. & FARRELL B.D. (2000). Phylogeny and host specificity of psoroptic mange mites (Acarina: Psoroptidae) as indicated by ITS sequence data. *J. Med. Entomol.*, **37**, 791–796.
30. ROSEN S., YERUHAM I. & HADANI A. (1989). *Chorioptes texanus* (Hirst 1924), Psoroptidae on cattle in Israel. *Acarologia*, **30**, 373–376.
31. SAMUEL W.M. (1981). Attempted experimental transfer of sarcoptic mange (*Sarcoptes scabiei*, Acarina: Sarcoptidae) among red fox, coyote, wolf and dog. *J. Wildl. Dis.*, **17**, 343–347.
32. SANDERS A., FROGGATT P., WALL R. & SMITH K.E. (2000). Life-cycle stage morphology of *Psoroptes* mange mites. *Med. Vet. Entomol.*, **14**, 131–141.
33. SMILEY R. L. (1970). A review of the family Cheyletiellidae (Acarina). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **63**, 1056–1078.
34. SMITH W.D., BATES P., PETTIT D.M., VAN DEN BROEK A. & TAYLOR M.A. (2002). Attempts to immunize sheep against the scab mite, *Psoroptes ovis*. *Parasite Immunol.*, **24**, 303–310.
35. SWEATMAN G.K. (1957). Life history, non-specificity, and revision of the genus *Chorioptes*, a parasitic mite of herbivores. *Can. J. Zool.*, **35**, 641–689.
36. SWEATMAN G.K. (1958). On the life history and validity of the species in *Psoroptes*, a genus of mange mites. *Can. J. Zool.*, **36**, 905–929.
37. WALL R. & KOLBE K (2006). Taxonomic priority in *Psoroptes* mange mites: *P. ovis* or *P. equi*? *Exp. Appl. Acarol.* **39**, 159–162.
38. WALTON S. F. & CURRIE B. J. (2007). Problems in diagnosing scabies, a global disease in human and animal populations. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 268–279.

39. YUNKER C.E. (1964). Infections of laboratory animals potentially dangerous to man: Ectoparasites and other arthropods, with emphasis on mites. *Lab. Anim. Care*, **14**, 455–465.
40. YUNKER C.E. (1973). Mites. *In: Parasites of Laboratory Animals*, Flynn R.J., ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 425–492.
41. ZAHLER M., ESSIG A., GOTHE R. & RINDER H. (1998). Genetic evidence suggests that *Psoroptes* isolates of different phenotypes, hosts and geographic origins are conspecific. *Int. J. Parasitol.*, **28**, 1713–1719.
42. ZAHLER M., ESSIG A., GOTHE R. & RINDER H. (1999). Molecular analyses suggest monospecificity of the genus *Sarcoptes* (Acari: Sarcoptidae). *Int. J. Parasitol.*, **29**, 759–766.
43. ZAHLER M., HENDRIKX W.M.L., ESSIG A., RINDER H. & GOTHE R. (2000). Species of the genus *Psoroptes* (Acari: Psoroptidae): A taxonomic consideration. *Exp. Appl. Acarol.*, **24**, 213–225.
44. ZAHLER M., HENDRIKX W.M.L., ESSIG A., RINDER H. & GOTHE R. (2001). Taxonomic reconsideration of the genus *Chorioptes* Gervais and van Beneden, 1859 (Acari: Psoroptidae). *Exp. Appl. Acarol.*, **25**, 517–523.

*

* *

CHAPITRE 2.9.9.

SALMONELLOSES*

RÉSUMÉ

La salmonellose est une maladie infectieuse de l'homme et de l'animal dont sont responsables les organismes de deux espèces de Salmonella (Salmonella enterica et S. bongori). Bien que la bactérie soit avant tout d'origine intestinale, les salmonelles diffusent largement dans l'environnement et sont habituellement retrouvées dans les effluents d'élevage, les eaux usées d'origine humaine et au niveau de matériels pouvant être sujet à une contamination fécale. Les salmonelles sont l'agent étiologique d'infections diarrhéique et systémique chez l'homme, le plus souvent en tant que contaminant secondaire d'aliment d'origine animale ou agricole ; en général la maladie chez l'homme fait suite à une infection sub-clinique des animaux entraînant une contamination de la viande, des œufs, et du lait ou encore une contamination secondaire des fruits et des légumes qui ont été fertilisés ou irrigués avec des eaux usées. La salmonellose humaine est l'une des plus fréquentes et importantes, pour ses conséquences économiques, maladies zoonotiques. Les salmonelles peuvent aussi être trouvées dans l'alimentation animale, entraînant un portage gastro-intestinal asymptomatique ou des maladies infectieuses chez l'animal, particulièrement chez les volailles et les porcs. La salmonellose a été identifiée dans de nombreux pays, mais semble être plus fréquente dans les zones d'élevage intensif, particulièrement de porcs et de vaches reproductrices et dans certains élevages de volaille en confinement. Les reptiles sont aussi habituellement porteurs asymptomatiques de salmonelles. Plusieurs sérovars sont spécifiques de leur hôte (par ex. S. Abortusovis chez les moutons ou S. Typhi chez les humains) ou adaptés à un hôte (par ex. S. Choleraesuis, S. Dublin).

La maladie peut atteindre toutes les espèces d'animaux domestiques ; les animaux jeunes et en gestation ou lactation sont les plus sensibles. Les maladies entériques sont la manifestation la plus fréquente, mais on peut observer une large variété de signes cliniques, tels qu'une septicémie aiguë, un avortement, de l'arthrite et des signes respiratoires. Beaucoup d'animaux, en particulier, le porc et la volaille peuvent être infectés mais sans montrer de signes cliniques. Ces animaux jouent un rôle important dans la diffusion de l'infection entre les différents élevages et également en tant que source de contamination des aliments et à l'origine de l'infection humaine.

La typhose et pullorose à S. pullorum, maladies des volailles causées par les salmonelles, sont mentionnées dans le Chapitre 2.3.11. de ce Manuel terrestre.

Identification de l'agent pathogène : *le diagnostic est basé sur l'isolement dans l'organisme à partir soit de tissus prélevés aseptiquement lors de l'autopsie, soit de fèces ou d'échantillons prélevés par écouvillonnage au niveau rectal, soit encore à partir de prélèvement réalisés sur le terrain, de produits alimentaires ou destinés à l'alimentation animale ; une infection préalable ou concomitante par certains sérovars peut aussi être diagnostiquée par la sérologie. En cas d'infection des organes génitaux, lors d'avortement ou au cours de la mise bas, il est nécessaire de mettre en culture le contenu stomacal du fœtus, et des frottis placentaires et vaginaux. Dans le cas de volaille, il convient de mettre en culture des œufs embryonnés.*

Les salmonelles peuvent être isolées en utilisant des techniques variées, qui peuvent inclure un pré-enrichissement pour revivifier les salmonelles moribondes, des milieux d'enrichissement contenant des substances inhibitrices pour éliminer la flore compétitive, et des géloses pour l'isolement sélectif afin de différencier les salmonelles des autres entérobactéries.

Divers tests biochimiques, sérologiques et moléculaires peuvent être appliqués sur une culture pure pour obtenir une confirmation définitive de la souche isolée. Les salmonelles possèdent des antigènes de type somatique (O), flagellaire (H) et de virulence (Vi), qui peuvent être mis en

évidence par des sérums de typage, et le sérovar peut être déterminé par référence à une formule antigénique du schéma de Kauffmann-White. De nombreux laboratoires envoient les isolats à un laboratoire de référence pour confirmer l'identité sérologique complète et réaliser la détermination du lysotype et du génotype de la souche lorsque c'est possible.

Épreuves sérologiques : des épreuves sérologiques peuvent être réalisées sur un échantillon statistiquement représentatif de la population, mais sont de valeur limitée si la vaccination est pratiquée. Chez les volailles, le test sur sang total est utilisé dans les élevages pour un diagnostic rapide de *S. Pullorum/Gallinarum*, ce test étant relativement fiable dans certaines circonstances. Au laboratoire, le test d'agglutination en tube est la méthode de choix pour les échantillons de toutes espèces animales à des fins de diagnostic et d'exportation. Des épreuves immuno-enzymatiques sont disponibles pour certains sérovars et peuvent être utilisées pour le diagnostic sérologique et la surveillance, en particulier pour les élevages de volaille et de porc. La vaccination peut compromettre la valeur diagnostique des épreuves sérologiques.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : plusieurs vaccins à bactéries inactivés sont utilisés contre la salmonellose et des vaccins à bactéries vivantes sont commercialement disponibles. Du fait de l'efficacité plutôt faible des vaccins à bactéries inactivées, des adjuvants huileux ou contenant des alhydrogels sont utilisés pour améliorer leurs propriétés immunogènes. Les données de terrain sur l'efficacité sont souvent manquantes, bien que les tests de laboratoire puissent fournir des informations utiles. Des tests d'innocuité sont réalisés en animalerie et, dans le cas des vaccins à bactéries inactivées, des tests de stérilité utilisant des milieux de culture d'enrichissement sont réalisés. D'autres précautions, tels que l'impact environnemental et la stabilité, sont nécessaires pour la production de vaccins préparés par manipulation génétique. L'exclusion compétitive peut être utilisée pour réduire l'infection salmonellique chez les volailles et dans d'autres espèces animales.

A. INTRODUCTION

Selon la dernière nomenclature, qui reflète les avancées récentes en taxonomie (42), le genre *Salmonella* comprend seulement deux espèces : *S. enterica* and *S. bongori*. Une troisième espèce potentielle, *S. subterranea*, a aussi été proposée à la suite de l'isolement unique à partir d'une souche inhabituelle trouvée dans l'environnement (24, 27, 50, 54). *Salmonella enterica* est divisée en 6 sous-espèces, qui se distinguent par certains caractères biochimiques et certains d'entre eux correspondent aux anciens sous-genres. Ces sous-espèces sont :

<u>Sous-genre d'origine</u>		<u>Nomenclature actuelle</u>
• Sous-espèces I	=	Sous-espèces <i>enterica</i>
• Sous-espèces II	=	Sous-espèces <i>salamae</i>
• Sous-espèces IIIa	=	Sous-espèces <i>arizonae</i>
• Sous-espèces IIIb	=	Sous-espèces <i>diarizonae</i>
• Sous-espèces IV	=	Sous-espèces <i>houtenae</i>
• Sous-espèces VI	=	Sous-espèces <i>indica</i>

Pour le sérovar *S. bongori*, le symbole V a été retenu pour éviter toute confusion avec le nom de sérovar *S. enterica* subsp. *enterica*. Les souches de *Salmonella* sont classées en sérovars sur la base de la diversité des antigènes (O) des lipopolysaccharidiques (LPS) et des protéines flagellaires (H) en accord avec le schéma de Kauffmann-White ; actuellement environ 2 500 sérovars sont reconnus (42). Ce nombre est en croissance constante. Les sérovars les plus fréquemment impliqués dans les infections humaine et animale appartiennent à la sous-espèce *enterica*. Les sérovars des autres sous-espèces sont plus aisément retrouvés chez les animaux à sang froid et dans l'environnement, mais sont parfois associés à une maladie humaine. Certains sérovars des sous-espèces *arizonae* and *diarizonae* ont été associés à des infections chez la dinde et le mouton et d'autres pourraient infecter des reptiles et des amphibiens en captivité ou à l'état sauvage.

Des noms ont été retenus seulement pour les sérovars appartenant à la sous-espèce *enterica*. Ces noms ne doivent plus être écrits en italique. La première lettre est en capitale. Il n'est pas nécessaire d'indiquer le nom de sous-espèce en pratique clinique, mais seulement le nom de sérovar de la sous-espèce *enterica*, par exemple, Typhimurium, London ou Montevideo sont des sérovars de la sous-espèce *enterica*. Le genre *Salmonella* suivi du nom du sérotype peut être utilisé en pratique (par ex. *Salmonella* Typhimurium). La plupart des sérovars des autres sous-espèces sont désignés par une formule antigénique, qui comprend le nom de la sous-espèce sous forme d'un chiffre romain (par ex. *Salmonella* IV 48:g.z51).

Dans ce chapitre, les abréviations des nouvelles conventions sont respectées, par exemple *S. Typhimurium* plutôt que la nomenclature complète *S. enterica*, subsp. *enterica* sérovar *Typhimurium*. Par ailleurs, des changements surviennent régulièrement à chaque fois que de nouveaux arguments sur la parenté génétique sont disponibles, par ex. *S. Pullorum* est maintenant classé comme *S. Gallinarum* biovar *Pullorum* (42).

Les salmonelloses sont des maladies infectieuses humaines ou animales dont deux espèces de *Salmonella* sont responsables (*Salmonella enterica* et *S. bongori*). Bien que la bactérie soit avant tout d'origine intestinale, les salmonelles diffusent largement dans l'environnement et sont habituellement retrouvées dans les effluents d'élevage, les eaux usées d'origine humaine et au niveau de matériels pouvant être sujet à une contamination fécale. La salmonellose a été identifiée dans de nombreux pays, mais semble être plus fréquente dans les zones d'élevage intensives, particulièrement dans les élevages de volaille et de porc.

La maladie peut atteindre toutes les espèces d'animaux domestiques ; les animaux jeunes et les femelles en gestation sont les plus sensibles. La maladie entérique présentant souvent une diarrhée profuse aqueuse ou sanglante avec hyperthermie est la manifestation clinique la plus fréquente, mais il est possible d'observer une large variété de signes cliniques tels qu'une septicémie aiguë, des avortements, des arthrites, une nécrose des extrémités et des signes respiratoires. Les signes et les lésions ne sont pas pathognomoniques. Beaucoup d'animaux, particulièrement les volailles et les porcs peuvent aussi être infectés sans présenter de signes cliniques (65). Ces animaux jouent un rôle important dans la diffusion de l'infection entre les différents élevages et également en tant que source de toxi-infection alimentaire. Ces dernières apparaîtront lorsque ces animaux entreront dans la chaîne alimentaire conduisant à des produits alimentaires contaminés (64, 65).

L'évolution de l'infection, les signes cliniques, les examens *post mortem* et les profils épidémiologiques varient selon le sérovar et l'espèce animale atteinte. Certains sérovares n'affectent que certains hôtes, par exemple *S. Gallinarum* pour les volailles ou *S. Choleraesuis* chez le porc, bien que la plupart des sérovares puissent être responsables d'infections chez une grande variété d'espèces animales (51). Beaucoup de sérovares (incluant ceux adaptés à l'hôte comme *S. Choleraesuis* et *S. Dublin*) ont été à l'origine d'une maladie chez l'homme ; les vétérinaires et les personnels en abattoir peuvent être infectés directement au cours de leur travail, de même que le personnel de laboratoire.

La maladie est couramment référencée comme une salmonellose, bien que le terme paratyphoïde puisse être employé, comme par exemple, la paratyphoïde porcine. En volaille, les termes de pullorose ou diarrhée blanche bacillaire et de typhose sont souvent utilisés pour décrire l'infection causée par *S. Pullorum* et *S. Gallinarum*, respectivement (51). La typhose et la pullorose sont traitées en détails dans le Chapitre 2.3.11. de ce *Manuel terrestre*.

Lors d'enquêtes épidémiologiques approfondies, l'identification de la souche est nécessaire et de telles enquêtes sont classiquement basées sur les méthodes biochimiques et sérologiques, la lysotypie de certains sérovares et l'antibiogramme. L'analyse génotypique de l'agent pathogène par des techniques d'amplification en chaîne par polymérase en temps réel et d'empreintes moléculaire de l'ADN a été utilisée avec de bons résultats ces dernières années. L'analyse des profils plasmidiques est une méthode rapide et relativement facile pour typer les souches, et a été utilisée à la fois en médecine humaine et vétérinaire pour étudier la diffusion des *Salmonella*. Cette technique a ses limites car toutes les souches de *Salmonella* ne portent pas de plasmides, et les plasmides peuvent être facilement acquis ou être de taille identique bien que génétiquement différents. La technique s'est cependant révélée utile lors d'enquêtes sur des foyers en complément d'autres techniques. D'autres méthodes génétiques, telles que l'électrophorèse en champ pulsé, l'analyse du polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP pour *amplified fragment length polymorphism*), l'étude du nombre variable des tandems répétés (VNTR pour *variable number tandem repeat*), l'analyse du polymorphisme d'un nucléotide simple (SNP pour *single nucleotide polymorphism*) et le ribotypage automatisé sont de plus en plus utilisées (4, 32, 53, 56). Le génotypage est un domaine qui s'est rapidement étendu et de nombreuses nouvelles techniques ont été développées ces dernières années. Il importe de savoir qu'une seule méthode ne fonctionne pas pour tous les isolats et qu'il peut être nécessaire d'évaluer un certain nombre de techniques différentes pour trouver une méthode ou une combinaison de méthodes satisfaisantes et capables de différencier les clones d'un sérovar ou d'un lysotype donné (45, 55). Les méthodes moléculaires sont souvent plus discriminantes et plus rapides que les techniques phénotypiques, comme par ex. le sérotypage et la lysotypie, et sont en train de les supplanter dans les recherches épidémiologiques. Cependant, ces techniques moléculaires peuvent ne pas être disponibles dans tous les laboratoires ; elles ne sont pas non plus nécessairement normalisées en vue de donner des résultats reproductibles dans des laboratoires différents. Il est donc possible que les isolats doivent être envoyés dans un Laboratoire de référence pratiquant ce type d'épreuve.

Des techniques génétiques comme les analyses par micro-puces ou PCR multiplex visant autant à l'identification des sérotypes spécifiques qu'à apporter des informations complémentaires sur le contenu des gènes, sont en cours de développement (18, 19, 44).

L'isolement et l'identification des salmonelles ne dépendent pas seulement de la qualité de l'échantillon, mais aussi des milieux de culture et des caractéristiques de croissance du sérovar, en particulier pour ceux adaptés à une espèce d'hôte. Une étude complète des infections à *Salmonella* chez l'animal domestique a été récemment publiée (65).

Des mesures nationales ont été mises en place dans de nombreux pays de façon à contrôler les infections à *Salmonella* chez l'animal afin de protéger le consommateur. La directive Zoonoses 2003/99/CEE de l'Union Européenne recommande la surveillance des élevages de plus de 250 animaux et des couvoirs pour *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium*. Dans une réglementation ultérieure, *S. Virchow*, *S. Infantis* et *S. Hadar* seront aussi soumis à des contrôles spéciaux (10). Les cultures à partir des litières des boîtes de transport des poulets et des poussins morts ou réformés sont réalisées le jour de l'arrivée. Après 4 semaines et 2 semaines avant la ponte, un mélange de fèces (jusqu'à 60 échantillons selon la taille de l'élevage) est mis en culture. Par la suite, les animaux adultes sont prélevés toutes les 2 semaines. Au niveau des couvoirs, le méconium ou les embryons morts sont mis en culture toutes les 2 semaines, bien qu'il soit question de remplacer cette pratique par un suivi dans les fermes ou au niveau des litières des boîtes de transport. Une nouvelle réglementation de l'UE pour le contrôle des salmonelles dans les élevages de poules pondeuses, de poulets de chair, de dindes et de porcs est actuellement mise en œuvre. Le suivi sérologique est autorisé mais comme une mesure complémentaire et ne peut en aucun cas remplacer le suivi bactériologique dans les élevages de volaille. Au Danemark, la surveillance sérologique pour *Salmonella* est utilisée pour les élevages de porc et les élevages commerciaux de ponte. Plusieurs autres pays ont mis en place des programmes de suivis sérologiques dans les élevages d'engraissement des porcs qui utilisent comme échantillons du « jus de viande » ou des sérums récoltés à l'abattoir.

Les infections à *Salmonella* des animaux de rente jouent un rôle important en santé publique et particulièrement en ce qui concerne la sécurité des aliments, car les produits alimentaires sont considérés comme la principale source des infections humaines à *Salmonella* (64). Des programmes spéciaux ont été mis en œuvre pour la surveillance des volailles, des porcs et des bovins incluant la surveillance des animaux sains porteurs asymptomatiques de la bactérie *Salmonella*. Les contaminations croisées au cours de la transformation dans le secteur agro-alimentaire sont également surveillées du fait qu'il peut exister une contamination à partir des manipulateurs sains (65).

La contamination de l'alimentation animale a été la cause la plus fréquente d'introduction de nouvelles souches de *Salmonella* dans les filières de production ; les salmonelles se sont répandues alors grâce aux déplacements des animaux ou par d'autres moyens. Le commerce national ou le commerce international du bétail ou d'autres animaux peuvent se révéler la principale menace de diffusion. Les aliments pour animaux peuvent aussi contenir de petites quantités de sérovars pathogènes provenant de « l'environnement », qui sont peu susceptibles d'entraîner des maladies ou des cycles d'infection chez les animaux. Étant donné que la contamination des aliments pour animaux peut être due à des sérovars impliqués en santé publique, les produits pour l'alimentation animale devraient être analysés pour la recherche de salmonelles (65). Comme les aliments pour animaux sont stockés et mélangés avec des ingrédients d'origine variée, il est possible de trouver des salmonelles « exotiques » dans ces aliments. Une fois installé dans une ferme, la transmission entre animaux et la contamination de l'environnement prennent le dessus pour assurer la pérennité de l'infection et sa dissémination.

Les échantillons d'alimentation humaine ou animale analysés pour la recherche de *Salmonella* devraient être vraiment représentatifs. Des étapes appropriées devraient être mises en œuvre pour prévenir toute contamination survenant durant le transport ou le stockage (20, 21). En raison de la grande variété de produits alimentaires pour l'homme et l'animal, il n'existe pas de méthode d'échantillonnage appropriée pour tous les produits. Cependant différentes méthodes spécifiques au produit doivent être utilisées (11, 22).

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) apporte des informations sur la mise en œuvre de mesures appropriées pour la prévention et la maîtrise des maladies transmises par les aliments, incluant les infections à *Salmonella* chez l'homme. Les œufs et les ovoproduits, la viande de volaille et la viande des autres animaux de rente, ainsi que les produits carnés sont le plus fréquemment impliqués dans la transmission de l'infection. En outre, des salades et des épices contaminés ont été impliqués dans de nombreux foyers. *Salmonella* Enteritidis et *S. Typhimurium* sont les sérovars les plus largement identifiés dans de nombreux pays européens (bien que les salmonelles soient rares dans les productions animales, certains pays de l'UE possèdent des programmes stricts de contrôle), alors que *S. Typhimurium* est le sérovar dominant dans l'Amérique du Nord (64).

Une maîtrise réglementaire de *Salmonella* dans un but de santé publique devrait couvrir toutes les étapes de « la fourche à la fourchette » ou de « l'étable à la table ». Cela inclut l'obligation de déclarer tous les foyers épidémiques de la maladie (13), et de tester les aliments, les animaux et les aliments pour animaux (65). La surveillance de l'alimentation animale comprend les composants de l'alimentation et les autres matières qui, sont distribuées non transformées ainsi que l'échantillonnage durant la fabrication des produits destinés à l'alimentation animale. Des enquêtes épidémiologiques à l'échelle mondiale devraient être faites pour surveiller la transmission des *Salmonella* et encourager les contrôles réglementaires de *Salmonella*.

Les contrôles sanitaires et d'hygiène à l'abattoir sont essentiels et des précautions spéciales devraient être appliquées quand l'abattage concerne des troupeaux infectés. Des mesures de décontamination devraient être mises en place tout au long de l'opération. Les vaccins étant de plus en plus fréquemment utilisés dans la lutte contre les salmonelles dans les élevages de volailles, il est important de pouvoir distinguer les souches vaccinales des souches sauvages et de vérifier que les souches vaccinales ne se répandent pas au-delà des lots d'animaux vaccinés (60).

Un autre élément essentiel dans la prophylaxie de la salmonellose humaine est l'éducation des détaillants et des consommateurs, en particulier l'attention portée à la manipulation et au stockage des aliments, l'hygiène des cuisines et une cuisson appropriée pour limiter le risque d'infection.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

La fréquence d'échantillonnage et le type d'échantillons obtenus dépendront largement des objectifs des programmes d'investigations (y compris les impératifs réglementaires), des données cliniques, du niveau de détection demandé ou de la précision requise sur les estimations de la prévalence, du coût des prélèvements et de la disponibilité des matériels, et enfin des équipements du laboratoire.

Des échantillons individuels sont collectés le plus aseptiquement possible pour des tests bactériologiques et, en cas de maladie clinique ou lors de suivi de routine, les échantillons doivent être collectés avant que tout traitement antibiotique ait été commencé. Les échantillons cliniques sont collectés préférentiellement durant la phase aiguë de la maladie ou le plus tôt possible après le décès. Dans le cas d'élevage intensif de volaille ou d'autres espèces d'oiseaux, des échantillons d'environnement prélevés sur le sol tels que des mélanges de fèces, la litière, la poussière ou des prélèvements réalisés sur les bottes à l'aide d'un écouvillon (5, 25), peuvent être le meilleur moyen efficace d'identifier les troupeaux infectés. Des précautions doivent être prises pour éviter les contaminations croisées des échantillons au cours de la collecte puis durant leur transport et au laboratoire. Les emballages doivent être gardés au froid et accompagnés d'informations adéquates. Pour les espèces animales plus petites, il est préférable de transmettre un nombre représentatif de malades ou d'animaux récemment décédés au laboratoire si c'est possible (63). Des sérovars adaptés à l'hôte sont en règle générale plus difficiles à isoler à partir de fèces, et si ces derniers sont suspectés, des tissus infectés devront être mis en culture dans la mesure où cela est possible.

Une attention particulière doit être portée à l'isolement de salmonelles à partir d'animaux présentant une infection sub-clinique, du fait que ceux-ci peuvent excréter la bactérie de façon intermittente et en faible nombre. L'augmentation de la taille de l'échantillon, du nombre d'échantillons représentant plus d'individus associée parfois au pooling des échantillons et à un échantillonnage répété peuvent augmenter la sensibilité du diagnostic. Dans de telles situations, les méthodes bactériologiques ou sérologiques devraient être utilisées pour identifier un troupeau infecté plutôt que pour identifier un animal infecté individuellement.

- **Culture**

De nombreuses méthodes sont largement utilisées à travers le monde pour l'isolement de *Salmonella* (9, 14, 17, 29, 46, 63). Celles qui sont les plus communes sont décrites ci-dessous. Les techniques de culture et les milieux qui sont les plus performants dans une situation donnée dépendent de plusieurs facteurs, y compris le type de *Salmonella*, la source et le type de prélèvements, l'espèce animale dont proviennent les prélèvements, l'expérience du microbiologiste et la présence de milieux d'enrichissement et de milieux sélectifs.

Tous les milieux de culture préparés doivent subir un contrôle de qualité et doivent permettre la croissance du micro-organisme recherché à partir d'un inoculum faible. La culture systématique d'une souche de référence en parallèle avec des échantillons de routine peut entraîner une contamination croisée des échantillons si les techniques sont réalisées sans précaution ; il convient donc d'utiliser un sérovar rare ayant des caractéristiques de croissance connues, semblables à celles des souches cibles considérées comme prioritaires.

L'usage croissant de programmes d'assurance qualité a conduit à l'emploi de plus en plus généralisé de méthodes internationales normalisées telle que l'ISO 6579:2002 ; même si celle-ci n'a pas été validée pour les échantillons de fèces et de l'environnement et qu'elle n'a été conçue que pour les aliments (pour l'homme et l'animal). Au cours des dernières années, une méthode normalisée pour la détection de *Salmonella* à partir des animaux de production a été mise au point et évaluée, et une méthode ISO est en cours d'adoption (35). L'essentiel de la méthode normalisée consiste en un pré-enrichissement dans de l'eau peptonée, un enrichissement sur le milieu semi-solide modifié de rappaport-Vassiliadis (MSRV) et un isolement sur du milieu xylose-lysine-désoxycholate (XLD) et sur gélose supplémentaire au choix.

a) Milieux de pré enrichissement

Le nombre de salmonelles dans les fèces d'un animal asymptomatique, dans les échantillons d'environnement, dans les produits d'alimentation animale ou humaine est très souvent faible, et il est nécessaire d'utiliser des milieux d'enrichissement tels que l'eau peptonnée tamponnée, ou le bouillon universel de pré-enrichissement pour permettre l'isolement. Ceci permet aux faibles nombres de salmonelles, qui autrement auraient été tuées par les effets toxiques des milieux d'enrichissement, de se multiplier, ou cela peut aider à revivifier des salmonelles qui ont été stressées par des traitements au froid, à la chaleur, à une exposition aux biocides ou par la dessiccation. Le pré-enrichissement peut ne pas être la meilleure méthode pour l'isolement des souches de *Salmonella* moins vigoureuses, telles que celles adaptées à un hôte, à partir des fèces du fait d'une croissance importante de la flore compétitive durant la phase de pré-enrichissement non sélective.

b) Milieux d'enrichissement

Les milieux d'enrichissement sont des milieux liquides ou gélosés semi-solides qui contiennent des additifs qui permettent sélectivement la croissance de salmonelles alors que la croissance des autres bactéries est inhibée. Néanmoins, certains peuvent être toxiques pour certains sérovars de *Salmonella*, comme par exemple, le sélénite qui inhibe *S. Choleraesuis* ou le vert brillant qui est toxique pour beaucoup de souches de *S. Dublin*. Des températures élevées ont aussi été utilisées pour augmenter la sélectivité du milieu d'enrichissement, et une température de 43 °C est utilisée dans certains laboratoires, bien que cela puisse être inhibiteur avec certains milieux, par exemple, le tétrathionate et le Rappaport-Vassiliadis inhibe les souches sensibles à la température, particulièrement *S. Dublin*, et une température de 41,5 °C est maintenant recommandée pour l'incubation du bouillon Rappaport-Vassiliadis (22). L'enrichissement sélectif par mobilité peut être aussi utilisé pour augmenter la sensibilité d'isolement de *Salmonella* et un milieu d'enrichissement semi-solide comme par exemple le MSRV ou le Diagnostic Semi-Solid *Salmonella* medium (DIASALM), peut permettre une sensibilité plus grande (59). La formulation du milieu (qui varie selon les fournisseurs et même parfois d'un lot à l'autre), la température et le temps d'incubation et le volume des échantillons utilisés pour ensemercer le milieu peuvent influencer sur le taux d'isolement et ces paramètres doivent toujours être pris en compte. Des exemples de milieu sélectif d'enrichissement sont le tétrathionate de sodium comme le bouillon Muller-Kauffman, le sélénite F, la sélénite cystéine, le bouillon vert brillant et les bouillons Rappaport-Vassiliadis ou le milieu semi-solide de Rappaport-Vassiliadis. Dans certains cas, il est préférable d'utiliser plus d'un bouillon sélectif ou de cultiver à la fois sur un milieu de pré-enrichissement et sur un milieu gélosé sélectif d'enrichissement, bien que les avantages que l'on en retire ne justifient pas toujours le surcoût. Du Ferrioxamine E peut aussi être ajouté aux milieux sélectifs pour améliorer l'isolement de *Salmonella* à partir de fer ou d'échantillons peu nutritifs tels que les œufs, l'eau ou le sol (46) ; des antibiotiques peuvent aussi être ajoutés pour augmenter les isollements des souches résistantes aux produits antimicrobiens.

c) Milieux d'isolement sélectif

Il existe des géloses sélectives solides qui permettent la croissance différentielle à des degrés variables. Ils inhibent la croissance des autres bactéries que *Salmonella* et donnent des informations sur les principales caractéristiques biochimiques différentielles - habituellement l'absence de fermentation du lactose et la production de sulfate d'hydrogène (H₂S). Les résultats sont lus après 24 et 48 h d'incubation à 37 °C. Les salmonelles forment des colonies caractéristiques sur de tels milieux qui sont habituellement distinguables des autres bactéries de la boîte, avec certaines exceptions pour *Proteus*, *Pseudomonas* et *Citrobacter*. Les salmonelles fermentant le lactose peuvent parfois être isolées et la production d'H₂S peut être variable. De telles souches atypiques peuvent être plus facilement détectées quand un milieu sélectif semi-solide est utilisé. Le milieu DIASALM est particulièrement utile dans ce cas. La confirmation par agglutination sur lame en utilisant des antisérums polyvalents O ou H ou des antisérums spécifiques peut être réalisée sur la zone de croissance liquide de la boîte. *Salmonella* Abortusovis est un sérovar à croissance lente et il est fréquent d'incuber les boîtes jusqu'à 72 h et d'utiliser des géloses au sang non sélectives. Des exemples de milieux sélectifs sont la gélose au vert brillant, la gélose au xylose-lysine-désoxycholate, la gélose au désoxycholate/citrate, la gélose Rambach, et la gélose au sulfate de bismuth, et bien d'autres encore peuvent être identifiées dans la littérature et les catalogues de milieux de cultures. Une grande diversité de géloses chromogènes est disponible maintenant. Beaucoup de celles-ci peuvent aider dans la différenciation des colonies suspectes, mais elles doivent être validées au regard du type d'échantillons, des systèmes de culture et de la gamme des sérovars, car dans certaines circonstances, leur sensibilité peut être faible.

- Identification des colonies suspectes (caractéristiques)**

Les colonies suspectes sont mises en culture sur des géloses sélectives et non sélectives pour s'assurer l'absence de contaminants tels que *Proteus* spp. En présence d'une culture pure abondante, les colonies suspectes peuvent être testées par agglutination sur lame à l'aide de sérums polyvalents pour le typage des *Salmonella* (28). Dans certains cas, la colonie suspecte peut ne pas agglutiner ou au contraire auto-agglutiner, et

il est nécessaire d'utiliser des tests biochimiques pour confirmer l'identité. Ces tests peuvent être réalisés en eau peptonnée additionnée de sucres ou à l'aide de systèmes commerciaux (tels que le système API (*Analytical Profile Index*), test OBIS, ou des milieux composés (tel que la gélose TSI [*Triple Sugar Iron*]) peuvent être utilisés pour l'identification des micro-organismes (12).

La détermination des facteurs antigéniques O et H, et dans certains cas de l'antigène Vi, est réalisée par agglutination directe sur lame ou par agglutination en tube en utilisant des antisérums spécifiques. En cas de micro-organisme biphasique, il est nécessaire de déterminer les deux phases par inversion de phase - cela entraîne un passage en gélose semi-solide contenant l'antisérum correspondant à la phase connue. L'orientation est facilitée par la disponibilité d'antisérums dirigés contre plusieurs facteurs, qui peut ensuite être poursuivie par l'utilisation de sérums de typage monovalent. Bien que de nombreux laboratoires puissent identifier les sérotypes les plus fréquents, il est nécessaire d'avoir recours à un Laboratoire de référence pour confirmer l'identité d'un isolat et lorsque cela est possible pour obtenir une information sur le lysotype, si un schéma est disponible, et le profil génétique.

Des tests biochimiques additionnels peuvent être nécessaires pour identifier certains variants de sérotype, par exemple le d-tartrate qui permet de différencier *S. Paratyphi* B var. Java de *S. Paratyphi* B. Les isolats doivent aussi être testés pour leur sensibilité aux antibiotiques, car l'émergence de souches multi-résistantes possédant des gènes transférables de résistance aux céphalosporines et aux fluoroquinolones devient source de préoccupations de plus en plus grandes (26, 43, 61). Les souches utilisées pour les vaccins à bactéries vivantes sont aussi fréquemment identifiées par des marqueurs de résistance, des changements biochimiques tels que l'auxotrophie ou l'aspect rugueux.

- **Méthodes d'identification immunologiques et moléculaires**

De nombreuses méthodes alternatives sont utilisées et commercialement disponibles (3, 6, 8, 12, 48, 49, 52, 57, 66). Elles comprennent des méthodes basées sur la conductance et l'impédancemétrie, sur la séparation immuno-magnétique (SIM), sur les techniques de type immuno-enzymatique (ELISA), sur des sondes géniques pour réaliser une amplification en chaîne par polymérase (PCR) incluant l'amplification de séquences nucléiques (NASBA) (6), une PCR en temps réel (16, 31, 40) ou une PCR quantitative (41). Plusieurs de ces méthodes n'ont pas été validées sur des échantillons fécaux ou prélevés dans l'environnement et, en outre, elles sont plus adaptées à l'analyse des échantillons alimentaires destinés à l'alimentation humaine (39). Les méthodes rapides sont souvent plus coûteuses que la méthode bactériologique conventionnelle, mais peuvent être économiquement intéressantes pour le tri d'échantillons lorsqu'il existe une faible prévalence de contamination ou lorsque les produits tels que les produits pour l'alimentation animale sont attendus être négatifs au test. Une méthode d'enrichissement par SIM associée à un ELISA ou une PCR peut donner des résultats en 24 h. Actuellement, aucune méthode rapide n'est capable de réaliser une détection directe des *Salmonella*, si bien que des étapes d'enrichissement sélectif ou non sélectif sont nécessaires (37). Ceci entraîne plus d'étapes et nécessite du temps dans la procédure de détection. Pour les méthodes basées sur la détection de l'ADN, l'inhibition de la réaction PCR par des éléments de la matrice présents dans l'échantillon pose problème et nécessite des extractions d'ADN adaptées, notamment lorsque les prélèvements utilisés sont des fèces (23). Des méthodologies rapides d'isolement peuvent être liées à des systèmes sophistiqués de détection, telles que les biosensors (38). Il y a beaucoup de variations et de développements de méthodes rapides pour la détection des *Salmonella* mais aucune n'a montré de façon satisfaisante qu'elle pouvait remplacer la culture dans toutes les circonstances. C'est pourquoi il n'est pas possible de détailler toutes les méthodes dans ce chapitre ou de faire des recommandations, mais les articles cités ci-dessus donneront de plus amples informations. Des efforts sont actuellement en cours pour normaliser l'utilisation de certaines méthodes rapides au niveau international (30), mais il reste encore un travail considérable à faire.

- **Exemple de procédures pour l'isolement *Salmonella* à partir de produits alimentaires pour l'homme et l'animal, d'échantillons fécaux et de l'environnement**

- i) Ajouter 10 à 25 g d'échantillon à 10 volumes d'eau peptonnée tamponnée à température ambiante. (NB : pour de nombreux sérovars adaptés à l'hôte et pour certains sérovars *arizonae*, il est préférable d'ajouter à l'échantillon le milieu sélectif d'enrichissement tel que le bouillon sélénite cystéine, et de tester des échantillons de tissus si cela est possible [incluant l'isolement direct] ; voir la méthode de culture pour *S. Pullorum/Gallinarum* dans le Chapitre 2.3.11. de ce *Manuel terrestre*).
- ii) Incuber l'eau peptonnée tamponnée à 37 °C pendant 16 à 20 h ;
- iii) Ensemencer 20 ml de Rappaport-Vassiliadis modifié semi-solide ou DIASALM dans une boîte de Petri avec 0,2 ml du bouillon d'eau peptonnée tamponnée incubée ;
- iv) Ensemencer 10 ml de bouillon tétrathionate avec 1 ml de bouillon d'eau peptonnée tamponnée incubée ;

- v) Incuber les bouillons Rappaport-Vassiliadis modifié semi-solide ou DIASALM à 41,5 °C et tétrathionate à 37 °C (s'assurer que la marque du tétrathionate est adaptée pour une utilisation à 37 °C) ;
- vi) Après 24 et 48 h d'enrichissement sélectif, isoler le Rappaport-Vassiliadis modifié semi-solide ou DIASALM en prenant à l'aide d'une anse 1 µl de produit à partir de la périphérie de la zone de croissance et isoler en stries une boîte de gélose Rambach ou de gélose au vert brillant et une boîte de gélose xylose-lysine-désoxycholate additionnée de novobiocine ;
- vii) Isoler 10 µl du bouillon tétrathionate sur une gélose Rambach ou une gélose au vert brillant et sur une gélose xylose-lysine-désoxycholate additionnée de novobiocine ;
- viii) Incuber les boîtes à 37 °C pendant 24 h ;
- ix) Vérifier jusqu'à 5 colonies suspectes (rouge/rose avec un rougissement du milieu sur la gélose au vert brillant, cramoisi avec les bords pâles ou orange/transparentes sur la gélose Rambach, rouge avec un centre noir xylose-lysine-désoxycholate) en utilisant les sérums poly « O » et poly « H » (phase 1 et phase 2) ou des milieux biochimiques composés ;
- x) Une culture de colonies hautement suspectes qui ne donnent pas de réactions d'agglutination avec les antisérums poly « H » sur des milieux non sélectifs doit être re-testée. Si une agglutination franche avec les poly « O » et poly « H » peut être obtenue, ceci est suffisant pour une confirmation présomptive. De tels isolats peuvent ensuite être sérogrupper. Si le résultat de l'agglutination n'est pas clair, il faut procéder aux tests biochimiques en utilisant les milieux composés tels que le TSI ou les tests ONPG (o-nitrophenyl-beta-d-galactopyranoside) et de l'urée ou des tests biochimiques commerciaux tels que la galerie API ID 32 E.

2. Épreuves sérologiques

• Identification sérologique des animaux, élevages et troupeaux infecté

Un certain nombre d'épreuves sérologiques ont été développés pour le diagnostic d'infection à *Salmonella* chez l'animal. En volaille, le test sur sang total, qui utilise un antigène coloré, et le test d'agglutination du sérum SAT (*Serum Agglutination Test*) ont été utilisés avec succès depuis plus de 50 ans pour l'identification des élevages infectés par *S. Pullorum/Gallinarum*. Du fait que *S. Enteritidis* possède le même groupe antigénique somatique D que *S. Pullorum/Gallinarum*, le test sur sang total et les tests reliés peuvent être utilisés pour le diagnostic de l'infection mais la sensibilité est faible. Plus récemment, d'autres tests tels que les ELISA (2, 58) ont été développés pour le diagnostic d'infections à *S. Enteritidis* et à *S. Typhimurium* en volaille et pour d'autres sérovars pour les animaux d'élevage. Les tests ELISA ont été utilisés efficacement pour identifier les bovins sérologiquement porteurs de *S. Dublin* et peuvent être appliqués au lait de mélange pour le dépistage dans les élevages laitiers. Le mix-ELISA est utilisé au Danemark sur le sérum ou le liquide provenant des échantillons de muscle congelés qui sont décongelés pour détecter les infections à *Salmonella* chez le porc (36). Un test similaire est utilisé pour la détection d'anticorps dirigés contre *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* dans le jaune d'œuf à partir des élevages commerciaux de poules pondeuses (13).

Certains tests ELISA sont maintenant utilisés en routine et un certain nombre sont commercialement disponibles mais leur normalisation est nécessaire. L'objectif de cette section est de prendre en considération les épreuves sérologiques qui ont été pleinement évaluées et utilisées en routine pour le diagnostic d'une salmonellose chez l'animal. D'autres épreuves qui sont encore au stade du développement ne seront pas examinées. De nouvelles épreuves sont fréquemment développées pour le diagnostic à *Salmonella*, une recherche sur internet est souvent le meilleur moyen d'obtenir des informations actualisées.

• Facteurs impliqués dans le diagnostic sérologique

1. Des méthodes sérologiques peuvent être utilisées pour identifier un élevage/troupeau infecté plutôt que d'identifier individuellement un animal infecté, bien que des tests répétés puissent être utilisés en élevage comme une aide dans l'élimination sélective des animaux porteurs chroniques. Des épreuves sérologiques sont habituellement connues pour détecter un nombre limité de sérovars ou de sérogroupes de *Salmonella*.
2. Il est maintenant bien reconnu que certains animaux présentant une réponse positive peuvent ne plus être infectés avec le micro-organisme *Salmonella*. De même et à l'inverse, des animaux qui sont excréteurs actifs de salmonelles, peuvent être sérologiquement négatifs. Des observations similaires peuvent aussi être appliquées aux méthodes de cultures bactériologiques, et des résultats négatifs de culture de fèces peuvent ne pas signifier automatiquement que l'animal n'est pas infecté. Néanmoins, aucune de ces situations ne doit être considérée comme un problème majeur si suffisamment de tests sont réalisés. Des animaux qui sont sérologiquement positifs peuvent avoir cessés d'excréter des salmonelles bien que des taux élevés d'immunoglobulines puissent circuler. D'autres animaux de l'élevage peuvent être encore infectés. Des animaux sérologiquement négatifs peuvent être la conséquence d'une infection récente avec une excrétion

avant la production maximale d'immunoglobulines ou d'infection avec des sérotypes moins invasifs. Des animaux infectés récemment devraient, en toute probabilité, être détectés sérologiquement par un programme de surveillance approprié durant toute la durée de vie de l'élevage/troupeau.

3. Les animaux nouveau-nés sont immunologiquement immatures et ne répondent pas sérologiquement au LPS de l'antigène somatique jusqu'à l'âge de 2 à 3 semaines. Ils doivent, néanmoins, produire une réponse sérologique à la protéine de l'antigène flagellaire. Les bovins peuvent ne pas donner de réponse jusqu'à l'âge de 10 à 12 semaines et les porcelets allaitants peuvent ne pas développer de réponse immunitaire ou présenter une réponse humorale qui reflète le statut immunitaire de la mère. Des réponses différentielles impliquant les différentes classes d'anticorps (IgM, IgA, IgG) peuvent servir pour distinguer les infections récentes des infections plus anciennes, mais cette méthode n'est pas en général pratique au niveau d'un troupeau car les animaux sont souvent à des stades d'infection différents. La plupart des tests sont basés sur la détection des IgG et un accroissement du taux d'anticorps est visible entre la première et la troisième semaine et persiste 2 à 3 mois.

Les poulets peuvent aussi acquérir des anticorps anti-*Salmonella* passivement à partir des parents par l'intermédiaire de la vésicule ombilicale ; cela peut signifier un élevage de parentaux infectés. Les mammifères peuvent acquérir les anticorps maternels par le colostrum.

4. L'immunisation a été utilisée depuis de nombreuses années pour contrôler certaines infections à *Salmonella* dans les élevages, et si le diagnostic sérologique est utilisé, il est nécessaire de différencier la réponse vaccinale d'une infection en cours. Beaucoup de vaccins à bactéries vivantes par voie orale ne donnent pas de réponse significative en anticorps chez la plupart des animaux, mais des exceptions sont possibles. Des vaccins à bactéries inactivées injectables utilisés pour contrôler *S. Enteritidis* chez les poulets peuvent entraîner une réponse humorale de très longue durée. Il serait avantageux de produire un vaccin à bactérie vivante avec un marqueur car ainsi une distinction à l'aide de tests sérologiques pourrait être faite entre une réponse immunologique contre une souche sauvage et la souche vaccinale.
5. Les effets de l'antibiothérapie sur la réponse sérologique restent peu clairs. Certains travaux ont trouvés des titres diminués suite à une thérapie, alors que d'autres ne trouvent aucun effet. La sérologie peut néanmoins être une technique de diagnostic de salmonellose plus utile que la bactériologie si l'antibiothérapie a été utilisée.
6. Il existe approximativement 2 500 sérovars différents de *Salmonella*. En fonction de l'antigène et du test utilisé, des réactions sérologiques croisées entre différent sérovars peuvent se produire, par exemple entre *S. Typhimurium*, *S. Pullorum* and *S. Enteritidis*. Dans certains cas, des réactions croisées peuvent survenir après exposition à d'autres micro-organismes que des salmonelles.
7. Chez les volailles, la recherche d'immunoglobulines à *Salmonella* peut être réalisée sur le jaune d'œuf et les œufs peuvent fournir une méthode pour le dépistage chez les troupeaux. Cette approche est utilisée pour la surveillance des élevages de poules pondeuses au Danemark. Chez les bovins, les anticorps anti-*Salmonella* peuvent être recherchés dans le lait afin de réaliser un dépistage quotidien parmi le troupeau.
8. L'emploi de disques de papier filtre pour la collection de sérums élimine la nécessité de séparer le sérum. Les disques fournissent une conservation à long terme et diminue le coût du transport au laboratoire. La sensibilité du test peut être légèrement diminuée comparée aux tests effectués sur des sérums frais.

a) Test sur sang total

Le test sur sang total fournit un test rapide de détection de la typhoïde aviaire et de l'infection à pullorum qui peut être mis en œuvre à la ferme. La sensibilité du test sur sang total est faible et des résultats faux positifs et faux négatifs liés à l'inexpérience peuvent survenir.

Une description détaillée du test sur sang total est donnée dans le Chapitre 2.3.11. concernant la typhose aviaire et l'infection à Pullorum.

b) Test rapide d'agglutination sur lame

Le sérum (0,02 ml) est mélangé avec un antigène polyvalent coloré au cristal violet (0,02 ml). Le mélange est doucement agité pendant 2 min, après cela le test est lu. Les réactifs du test sont gardés à 4 °C doivent être remis à température ambiante avant d'être utilisés.

Les sérums à tester doivent être exempts de contamination ou d'hémolyse. Il peut être utile de réaliser une centrifugation des échantillons qui ont été conservés pendant un certain temps.

Si des réactions faussement positives non spécifiques sont redoutées, les sérums suspects positifs doivent être re-testés après un traitement à la chaleur à 56 °C pendant 30 min.

c) Test d'agglutination du sérum

Le SAT est relativement peu sensible et beaucoup d'animaux âgés ont des niveaux faibles d'agglutinines dans leur sérum dus aux entérobactéries autre que *Salmonella*. Les échantillons individuels analysés ont peu de valeur diagnostique hormis pour effectuer un dépistage initial au niveau de l'élevage. Pour confirmer une infection en cours, il est nécessaire d'analyser les échantillons en double. Le test est relativement peu coûteux ; les antigènes peuvent être préparés facilement et il n'est pas nécessaire de disposer d'équipement coûteux. Le SAT peut être adapté au format des microplaques et peut être facilement utilisé pour déterminer les titres somatiques et flagellaires. Il est conseillé de disposer de sérums de référence et de méthodes de confirmation pour le contrôle qualité de la pureté et de l'immunogénécité de la (des) préparation(s) de l'antigène SAT qui ne sont pas dépendantes des sérums produits à partir de ces antigènes.

• Préparation des antigènes somatiques

- i) Isoler une culture de *Salmonella* à partir d'une culture appropriée sur une gélose au sang (BAB) ou un autre milieu adapté, pour la croissance de colonies isolée. Incuber toute la nuit à 37 °C (± 2 °C) ;
- ii) Sélectionner une colonie régulière et réaliser une agglutination sur lame de façon à vérifier que l'antigène somatique visé est présent ;
- iii) Inoculer la pente d'une gélose nutritive à l'aide d'une anse stérile à partir de la colonie sélectionnée.
- iv) Incuber la culture pendant 8 à 12 h à 37 °C (± 2 °C) ;
- v) Laver la culture à l'aide d'une pipette Pasteur, de préférence à l'intérieur d'un espace sécurisé avec approximativement 2 ml d'alcool absolu et transférer dans un récipient universel stérile ;
- vi) Laisser l'antigène pendant 4 à 6 h à température ambiante pour permettre à l'alcool de tuer les bactéries et de détacher les flagelles ;
- vii) Centrifuger le récipient universel à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse pendant 5 min à 1 000 *g*. Éliminer le liquide et ajouter suffisamment de sel de phénol pour obtenir une opacité d'antigène équivalente au tube de Brown No. 2 (approximativement 10^8 colonies formant unité/ml) ou à une autre référence appropriée ;
- viii) Réaliser un titrage classique avec un sérum connu pour s'assurer que l'antigène correspond au facteur souhaité ;
- ix) Garder au froid à 4 °C jusqu'à l'utilisation.

• Préparation des antigènes flagellaires

- i) Isoler une culture de *Salmonella* à partir d'une culture appropriée sur une gélose au sang (BAB) ou un autre milieu adapté, pour la croissance de colonies isolées. Incuber toute la nuit à 37 °C (± 2 °C) ;
- ii) Réaliser un passage en gélose semi-solide (à approximativement 0,3 %) dans un tube de Craigie, ou un autre récipient adapté pour induire une expression optimale des antigènes flagellaires visés. Si le sérovar est biphasique, un antisérum H correspondant à la phase que l'on souhaite supprimer est ajouté à la gélose ;
- iii) Utiliser l'agglutination sur lame pour vérifier que la salmonelle est dans la phase souhaitée. Si cela est correct, inoculer une anse de culture dans 20 ml de bouillon nutritif. Incuber pendant 12 à 18 h à 37 °C (± 2 °C) pour une croissance optimale (si la phase est incorrecte, refaire un passage sur gélose semi-solide) ;
- iv) Pipetter 250 μ l de 40 % formol dans la suspension antigénique (utiliser des gants et travailler de préférence en poste de sécurité), et laisser une nuit ;
- v) Tester l'antigène par le SAT en utilisant un sérum test approprié ;

• Protocole

- i) Il est plus facile de tester les sérums à une dilution de 1/20 ; 0,25 ml d'antigène est additionné à 0,25 ml de sérum pré-dilué au 1/10 dans une solution saline ;
- ii) Les échantillons sont incubés au bain Marie à 50 °C pendant 24 h dans le cas des antigènes somatiques et pendant 4 h pour les antigènes flagellaires. La dilution et le temps d'incubation peuvent varier selon les antisérums utilisés ;

- iii) Les sérums donnant une réaction positive sont dilués au 1/20 jusqu'au 1/320 et re-testés avec les antigènes appropriés.

d) Méthodes immuno-enzymatiques pour *Salmonella Enteritidis*

Deux principaux types de méthodes existent pour la détection des IgG (IgY) spécifiques de *S. Enteritidis* : l'ELISA indirect (2) et la méthode ELISA compétitive de type « sandwich » (58).

Le test ELISA indirect comprend l'utilisation d'un antigène de détection fixé sur les puits de la microplaque. Après l'application d'un réactif de blocage de la réaction pour réduire la fixation non spécifique, les échantillons à tester sont introduits dans les puits. Un lien spécifique à l'anticorps de l'échantillon est détecté par l'addition d'un anticorps couplé à un conjugué enzymatique. Différents antigènes comprenant le LPS, les flagelles, les fimbriae SEF14, les protéines de la membrane externe et des préparations d'extrait d'antigènes cellulaires ont été utilisés.

La méthode ELISA de compétition de type sandwich utilise un réactif spécifique – un anticorps monoclonal (AcM) ou polyclonal – pour la fixation de l'antigène aux puits. Ceci est suivi par une préparation d'antigène purifiée ou non. Les échantillons sont testés suivi de l'addition d'un anticorps conjugué, qui ne se fixera pas à l'antigène si l'échantillon contient les anticorps spécifiques. La durée de l'essai peut être raccourcie en ajoutant ensemble l'échantillon à tester et le conjugué. Les AcMs ont été préparés pour le LPS, les flagelles et le SEF14 de *S. Enteritidis*.

Les deux systèmes présentent des avantages et des inconvénients. L'essai indirect est plus simple et les réactifs sont disponibles pour tous les sérotypes de *Salmonella* provenant de poulet, dinde, canard et de mammifères. L'ELISA de compétition peut être appliqué à toutes les espèces animales et il montre, en général, une spécificité plus importante. Quoiqu'il en soit, les réactifs ne sont pas commercialement disponibles pour tous les sérotypes. Il y a aussi des problèmes d'affinité et il peut être moins sensible que le test indirect. En pratique, les deux systèmes ont montré des réactions faussement positives et dans certains cas le tri avec un test ELISA indirect sur le LPS peut être suivi d'une confirmation avec un ELISA de compétition sur les flagelles.

Les méthodes peuvent être utilisées avec du sérum, du jaune d'œuf ou du sang séché reconstitué à partir de disque de papier filtre. Un ELISA mixte (ou ELISA sur jus de viande) est utilisé au Danemark et dans d'autres pays pour détecter l'infection chez le porc (36). Cet ELISA contient les antigènes LPS « O » 1, 4, 5, 6, 7 et 12, de *S. Typhimurium* et de *S. Choleraesuis*, qui rend ce test capable de détecter sérologiquement plus de 95 % des sérogroupes de *Salmonella* trouvés chez les porcs dans la plupart des pays européens. Des antigènes du groupe D ont aussi été incorporés dans certains kits ELISA. Le sérum est utilisé pour effectuer un dépistage dans les élevages de multiplication et les troupeaux reproducteurs alors qu'à l'abattoir, le test est réalisé sur le liquide tissulaire (jus de viande) qui est libéré lorsque 10 g d'un échantillon de muscle congelé est décongelé.

Avec certains ELISAs, une différenciation peut être faite entre les infections produites par des sérotypes de *Salmonella* appartenant à différents sérogroupes. Certaines réactions croisées peuvent se produire entre les groupes B et D et d'autres sérovars invasifs. Néanmoins, il y a habituellement une réponse sérologique plus grande lorsque le LPS d'un sérotype homologue est utilisé dans le test ELISA. La méthode optimale pour choisir le seuil de la valeur d'absorbance, au delà de laquelle les sérums sont considérés comme provenant d'un troupeau infecté à *S. Enteritidis* sans produire des taux inacceptables de faux positifs, n'a pas encore été fixée par un accord international.

Les ELISAs sont facilement adaptables à l'automatisation et par conséquent à des programmes de contrôle à grande échelle. Un problème majeur est l'équipement coûteux nécessaire et beaucoup de réactifs sont aussi très coûteux. Plusieurs kits de diagnostic ELISA pour *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* et un ELISA mixte pour le groupe B/C sont commercialement disponibles. Ils devraient idéalement être validés par des essais circulaires internationaux avant d'être adoptés à des fins de surveillance.

Un exemple d'ELISA validé est celui développé au Laboratoire de référence de l'OIE au VLA de Weybridge (voir Tableau dans la partie 3 de ce *Manuel terrestre* pour l'adresse). Les exigences sont mentionnées ci-dessous.

- **Équipement**

Plaques en PVC de type Falcon microtest III ; des pipettes adaptées et des éprouvettes ; laveur de plaques ; lecteur de plaques ELISA ; filtre pour le test à 405-410 nm et filtre de référence à 630 nm.

- **Antigène**

- L'extrait au phénol de LPS de *S. Enteritidis* est commercialement disponible (Sigma Cat. No. L6011). Celui-ci est reconstitué avec 1 ml d'eau désionisée et conservé à -20°C dans 100 μl en aliquots dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,2, à une concentration de 2,5 mg/ml. Lors de l'utilisation, l'antigène sera décongelé dans le tampon de fixation à la concentration appropriée ;
- L'antigène LPS peut aussi être préparé par la technique de Westphal & Luderitz (62) et normalisé pour sa concentration en carbohydrate, selon la méthode de Gerhardt (15), et ajusté à 1 000 $\mu\text{g/ml}$.

- **Diluant du sérum et du conjugué**

Ajouter la sérumalbumine bovine (BSA) (2 g) et le Tween 20 (0,05 ml) au PBS (100 ml) (alternativement, la poudre de lait [1 g] peut remplacer le BSA). Conserver à 4°C et faire une solution fraîche toutes les semaines.

Tampon de fixation : ajouter du carbonate de sodium (1,59 g) et du bicarbonate de sodium (2,93 g) à l'eau désionisée (1 litre) et ajuster au pH 9,6 (alternativement, dissoudre un comprimé de 0,05 M Sigma de tampon carbonate/bicarbonate [Cat. No. C-3041] dans l'eau désionisée [100 ml]). Conserver à 4°C et renouveler toutes les 2 semaines.

Tampon du substrat : faire une solution de diéthanolamine à 10 % dans l'eau désionisée. Le diéthanolamine doit être préchauffé à 37°C avant de l'utiliser et le pH de la solution doit être ajusté à pH 9,8 avec 1 M d'acide hydrochlorique. Conserver à 4°C et renouveler toutes les 2 semaines.

Conjugué enzymatique : immunoglobulines anti-poulet de chèvre conjuguées à la phosphatase alcaline (par exemple ICN Immunobiologicals, fournisseur alternatif Sigma : A9171) ou globulines anti-poulet d'autres espèces. Conserver à 4°C dilué dans le diluant à une concentration appropriée et renouveler chaque semaine.

Substrat enzymatique : Dissoudre un comprimé de phosphate disodique de *p*-nitrophényl (5 mg) dans le tampon du substrat (5 ml) pas plus de 30 min avant la répartition et conserver à l'obscurité.

- **Réactifs de référence**

- Les antisérums témoins positifs sont préparés par inoculation intramusculaire de 4 poulets âgés de 1 semaine et exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) avec un inoculum contenant 10^6 *S. Enteritidis*. Le sérum est alors obtenu 3 à 4 semaines plus tard quand les titres sont maximaux ;
- Le sérum A témoin négatif provient de 4 oiseaux EOPS âgés de 1 semaine ;
- Le sérum B témoin négatif provient de 58 oiseaux d'élevage âgés de 1 semaine et connus pour être indemnes d'infections à *Salmonella*. Les sérums sont mélangés et conservés dans 100 μl à -20°C .

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Beaucoup de vaccins à bactéries inactivées sont utilisés contre les salmonelloses causées par différents sérovars chez différentes espèces animales, comprenant un vaccin combiné à *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* pour un usage chez les volailles. L'inactivation est généralement obtenue soit par chauffage soit par l'utilisation de formol et d'un adjuvant tel que l'alhydrogel, fréquemment utilisé. Les vaccins à bactéries vivantes ont également été utilisés dans de nombreux pays ; ils comprennent les souches semi-rough tels que 9R pour la typhoïde aviaire et HWS51 pour les infections à *S. Dublin* (33). D'autres vaccins à bactéries atténués contiennent des mutants auxotrophes et des mutants ayant subi une « dérive métabolique », qui sont souvent utilisés pour prévenir les infections à *Salmonella* chez l'animal d'élevage en Allemagne et pour *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* chez les volailles au Royaume-Uni. Des vaccins avec des mutants raisonnablement atténués par des techniques de biologie moléculaire de délétion de gènes ont été développés pour la volaille et d'autres espèces ; ils comprennent les *aroA* mutants et les souches avec des mutations dans les gènes codant l'adénylate cyclase (*cya*) et la protéine du récepteur monophosphate de l'adénosine cyclique (*crp*) (7), qui est disponible aux États-Unis d'Amérique. En Europe, les organismes génétiquement modifiés ne sont normalement pas autorisés pour les vaccins.

Des lignes directrices pour la fabrication des vaccins à usage vétérinaire sont données dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ci-dessous et dans le

Chapitre 1.1.8. sont volontairement de nature générale et peuvent être complétées par des exigences nationales et régionales.

1. Gestion des semences bactériennes

a) Caractéristiques de la semence bactérienne

Pour les vaccins à bactéries inactivées ou vivantes, la souche bactérienne doit être un organisme le plus proche possible des souches de terrain circulant. Elle doit être choisie avec attention à partir des cas cliniques, et sa virulence et sa production d'antigène doivent être estimées. Il est préférable de tester un panel de souches potentielles dans ce but avant de tester la sélection finale. La souche vaccinale finale doit être identifiée par des données historiques et caractérisée par des marqueurs phénotypiques et/ou génotypiques stables. Les souches vaccinales vivantes doivent être marquées par des caractères stables permettant la distinction d'avec les souches sauvages. Des marqueurs tels que la résistance aux antibiotiques, par exemple à la rifampicine peuvent être utilisés. L'atténuation de la virulence doit être stable et obtenue de préférence par deux mutations indépendantes. La stabilité des souches des vaccins à bactéries vivantes peut être vérifiée par des contrôles périodiques en utilisant des techniques moléculaires sensibles d'empreinte et de micro-puces.

b) Méthode de culture

La culture est propagée et maintenue en utilisant des milieux adaptés, parmi lesquels beaucoup ont été décrits (*se reporter à la littérature scientifique sur le sujet*) pour la croissance de *Salmonella*. Les milieux utilisés ne doivent pas contenir de sérums ou de tissus d'origine animale. Les cultures peuvent se réaliser sur des milieux solides, en flacon de Roux, ou en milieu liquide, auquel cas des équipements de fermentation à large échelle peuvent être utilisés. La restriction en fer ou l'incubation à basse température sur un milieu minimal peut augmenter la production d'antigène LPS par la souche vaccinale.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

i) Pureté

La souche vaccinale doit être vérifiée selon les critères suivants :

- Coloration d'un étalement d'une suspension bactérienne sur une lame de verre par la coloration de Gram.
- Homogénéité de la culture sur milieu non sélectif.
- Exigences métaboliques comme celles indiquées par les tests biochimiques.
- Détection des marqueurs et lysotypie.
- Agglutination avec des sérums spécifiques.

ii) Innocuité

La DL₅₀ (50 % de la dose létale) ou DI₅₀ (50 % de la dose infectieuse) doivent être déterminées sur la souris. Dix fois la dose vaccinale vivante de terrain et 2 fois la dose du vaccin à bactérie inactivée doivent être administrées à des espèces cibles avec des exigences d'âge et de voies d'administration. Les animaux sont maintenus en observation. La stabilité et la non réversibilité de la virulence doivent être démontrées pour les vaccins à bactéries vivantes après plusieurs passages sur des espèces sensibles. Il est aussi nécessaire de considérer les vaccinations répétées. Les vaccins à bactéries vivantes doivent montrer qu'ils ne persistent pas longtemps chez l'animal vacciné ou qu'ils ne sont pas transmis au lait ou à l'œuf qui pourraient être consommés, et les méthodes d'utilisation ne doivent pas présenter de danger pour l'opérateur.

iii) Efficacité

Les analyses de laboratoire et les essais de terrain doivent être utilisés pour montrer que le vaccin est effectif. Les essais de laboratoire consistent à réaliser des tests d'infection pour apprécier la vaccination dans l'espèce ciblée à la dose et à la période recommandée. Les résultats d'efficacité peuvent aussi être utilisés comme base pour une série de test d'activité. Les essais de terrain sont plus à intégrer dans les tests d'activité du fait de la difficulté de normaliser l'essai et d'obtenir des témoins appropriés.

iv) Aspects environnementaux

Les souches de vaccins à bactéries vivantes doivent être testées pour leur possibilité de survivre dans l'environnement et d'infecter des cibles non spécifiques, telles que les rongeurs et les oiseaux sauvages, qui peuvent y être exposées. Une persistance prolongée de vaccins à bactéries vivantes dans les fèces et la litière peut être considérée comme un risque inacceptable pour l'environnement

lorsque ces matériels sont enlevés des bâtiments. Les vaccins à bactéries vivantes ne doivent pas être utilisés chez les volailles en ponte.

2. Méthode de fabrication

Les vaccins doivent être produits dans des locaux adaptés propres dans lesquels ont accès seulement les personnes autorisées. Des précautions doivent être prises pour éviter les contaminations croisées entre les zones où l'organisme est vivant et les autres zones. Il ne doit y avoir aucune contamination des opérateurs et/ou de l'environnement et la préparation vaccinale doit être localisée dans une zone séparée du travail de diagnostic sur culture. Les opérateurs ne doivent pas travailler avec les vaccins lorsqu'ils sont malades et ne doivent pas être sensibles aux conditions d'immunosuppression ou aux médicaments. Le personnel doit porter des vêtements de protection en zone de production et dans les animaleries.

Les lots de cultures sont préparés à partir d'un lot primaire et le nombre de passages dépend de la validation du procédé. Les vaccins peuvent être préparés par inoculation d'un milieu adapté, tel qu'un bouillon nutritif, avec une culture fraîche et une incubation à 37 °C pendant 24 h, avec ou sans oxygénation. Les organismes sont récupérés par sédimentation ou centrifugation. Alternativement, les organismes peuvent être mis en culture et récupérés sur un milieu solide, tel que la gélose nutritive. Dans le cas de vaccin à bactérie vivante, la suspension est diluée en PBS, pH 7,0, et peut être congelée déshydratée.

Le temps d'inactivation d'un vaccin à bactérie inactivée doit être au moins de 33 % de plus que celui nécessaire à la diminution d'un nombre viable de cellules jusqu'à un taux indétectable. Le procédé d'inactivation doit être appliqué à l'ensemble du volume des cellules vaccinales collectées.

Les agents de conservation, les excipients de lyophilisation, les stabilisateurs pour les conteneurs multidoses ou les autres substances ajoutées ou combinés avec la préparation vaccinale ne doivent pas avoir d'effets délétères sur le potentiel immunogène du produit.

3. Contrôles en cours de fabrication

Les points suivants doivent retenir l'attention :

- Contrôle visuel de la suspension, homogénéité par la coloration de Gram, culture sur milieu non sélectif.
- Agglutination sur lame par des antisérums spécifiques.
- Titrage des bactéries par turbidimétrie et/ou dénombrement sur boîte.
- Test d'inactivation effective (vaccin à bactérie inactivée) par isolement sur milieu non sélectif ou utilisation d'un milieu qui donne une chance optimale de culture, par exemple milieu de production avec neutralisation des agents d'inactivation.
- Titrage des bactéries viables (vaccin à bactérie vivante) avant et après lyophilisation.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Les tests 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

Un test de laboratoire sur souris qui a montré précédemment une corrélation avec l'innocuité sur les espèces cibles peut être utilisé pour déterminer la DL₅₀ et/ou la DI₅₀. Chaque lot doit être testé sur les espèces cibles à la période et aux voies d'administration recommandées, en utilisant au moins 2 fois la dose de terrain pour les vaccins à bactéries inactivées et 10 fois pour les vaccins à bactéries vivantes.

c) Activité

L'activité est testée par une épreuve d'infection pour apprécier la vaccination sur souris et/ou autres espèces, comprenant (si possible) les espèces cibles et la réponse immunologique des espèces cibles.

d) Durée de l'immunité

La période d'immunité est probablement variable selon les produits, les régimes de vaccination et les individus vaccinés. L'immunité à *Salmonella* est normalement spécifique du sérotype. Des consultations auprès de collègues suggèrent que la plupart des vaccins à bactéries inactivées procurent une protection de

6 mois, alors que certains vaccins à bactéries vivantes administrés par injection apportent une immunité plus longue, qui peut aller jusqu'à 1 an ou plus. Il doit être rappelé, toutefois, qu'une pression d'infection forte, telle que celle observée dans une ferme continuellement contaminée ou lors de rongeurs continuellement infectés, peut déborder l'immunité vaccinale et les vaccins à bactéries vivantes du commerce peuvent être atténués afin de réduire la survie dans le milieu extérieur de telle manière que la réponse immunitaire est réduite. Des problèmes peuvent aussi survenir si l'administration orale des vaccins à bactéries vivantes ou si l'injection des vaccins à bactéries inactivées ou vivantes ne sont pas correctement réalisées.

e) Stabilité

Les informations manquent sur la stabilité des vaccins à bactéries inactivées. La stabilité peut varier selon les conditions de conservation et par la présence de micro-organismes contaminants poussant dans le produit. La stabilité est évaluée par des tests d'activité répétés à un intervalle de temps approprié. La stabilité des vaccins à bactéries vivantes peut être donnée par la réalisation de dénombrement des organismes viables répété à des intervalles de temps appropriés.

f) Agents de conservation

Des produits chimiques avec une activité antimicrobienne tels que le thiomersal, le phénol ou le crystal violet, sont souvent inclus comme agents de conservation dans les vaccins à bactéries inactivées.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Certain vaccins à bactéries inactivées peuvent occasionnellement engendrer des avortements du fait du LPS présent et, pour les mêmes raisons, les vaccins à virus vivants doivent être utilisés avec prudence chez les femelles en gestation. Cependant, Il est souvent nécessaire de vacciner les femelles en gestation afin de permettre le transfert de l'immunité maternelle à leur progéniture. Il peut être utile d'inclure des tests de recherche d'endotoxine dans le programme d'innocuité de manière à ce que les taux puissent être comparés à ceux garantis comme sûrs dans les tests de double dose. Des vaccins peuvent aussi causer des tuméfactions au point d'injection.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Les vaccins à bactéries inactivées sont testés par le test de double dose, et les vaccins à bactéries vivantes sont testés en utilisant 10 fois la dose sur les espèces cibles.

b) Activité

Si possible, le contrôle de l'activité doit être relié à l'efficacité du vaccin dans les espèces cibles, et des critères adaptés doivent être appliqués pour valider les lots. Il peut être possible d'évaluer la réponse d'un vaccin à bactéries inactivées par la réponse d'anticorps contre O et H produits, quoiqu'il faille se souvenir que la réponse anticorps est seulement une part des mécanismes de protection de l'hôte contre *Salmonella*. Alternativement, l'activité du vaccin peut être obtenue par les effets de la DL₅₀ chez la souris.

D. EXCLUSION COMPÉTITIVE

La sensibilité à l'infection à *Salmonella* chez la volaille peut être réduite sensiblement par un traitement par spray ou oral avant l'exposition (idéalement dans l'écloserie) avec une culture en anaérobiose de microflore caecale qui inhibe la colonisation par *Salmonella* en occupant les sites de colonisation au niveau de l'intestin, en produisant des acides et d'autres substances inhibitrices, et en stimulant une réponse immunitaire non spécifique locale de la muqueuse. Ce traitement est largement utilisé dans certains pays mais uniquement comme une aide à la décontamination d'élevages infectés de façon persistante entre autres. Il est aussi utile de minimiser les perturbations de la flore intestinale après des traitements antimicrobiens ou un stress et de potentialiser l'effet des vaccins administrés par la suite. Comme pour tout traitement qui réduit la prévalence ou le nombre des salmonelles excrétées par les groupes d'animaux infectés, une certaine interférence peut exister entre les programmes de suivi ; l'échantillonnage et la sensibilité du test devront être ajustés selon les circonstances pour compenser cette interférence (1, 34, 47).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANDREATTI R.L., SAMPAIO H.M., BARROS M.R., GRATAO P.R. & CATANEO A. (2003). Use of caecal microflora cultured under aerobic or anaerobic conditions in the control of experimental infection of chicks with *Salmonella* Enteritidis. *Vet. Microbiol.*, **92**, 237–244.
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. BLACKBURN C DE W. (1993). A Review: Rapid and alternative methods for the detection of salmonellas in foods. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**, 199–214.
4. BOXRUD D., PEDERSON-GULRUD K., WOTTON J., MEDUS C., LYSZKOWICZ E., BESSER J. & BARTKUS J.M. (2007). Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 536–543.
5. CALDWELL D.J., HARGIS B.M., CORRIER D.E. & DELOACH J.R. (1998). Frequency of isolation of *Salmonella* from protective foot covers worn in broiler houses as compared with diagnostic sampling. *Avian Dis.* **42**, 381–384.
6. COOK N. (2003). The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *J. Appl. Microbiol.*, **53**, 165–174.
7. COOPER G.L. (1994). Salmonellosis – infections in man and the chicken: pathogenesis and the development of live vaccines – a review. *Vet. Bull.*, **64**, 123–143.
8. DE BOER E. & BEUMER, R.R. (1999). Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.*, **50**, 119–130.
9. 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, USA.
10. EUROPEAN UNION (2003). Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC (*Official Journal of the European Union: Legislation*, **325** [12.12.2003], 31–40).
11. EUROPEAN UNION (1995). Council Directive 95/53/EEC of 25 October 1995 fixing the principles governing the organisation of official inspection in the field of animal nutrition.
12. EWING W.H. (1986). Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, Fourth Edition. Elsevier, New York, USA, London, UK, and Amsterdam, The Netherlands.
13. FELD N.C., EKEROTH L., GRADEL K.O., KABELL S. & MADSEN M. (2000). Evaluation of a serological *Salmonella* mix-ELISA for poultry used in a national surveillance programme. *Epidemiol. Infect.*, **125**, 263–268.
14. FRICKER C.R. (1987). The isolation of salmonellas and campylobacters. *J. Appl. Bacteriol.*, **63**, 99–116.
15. GERHARDT P. (1981). Manual of Methods for General Microbiology. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 332–334.
16. GOODING C.M. & CHOUDARY P.V. (1999) Comparison of different primers for rapid detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*, **13**, 341–347.
17. HARVEY R.W.S. & PRICE T.H. (1974). Isolation of Salmonellas. Public Health Laboratory Service. Monograph Series 8. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
18. HERRERA-LEON S., MCQUISTON J.R., USERA M.A., FIELDS P.I., GARAIZAR J. & ECHEITA M.A. (2004). Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 2581–2586.
19. HERRERA-LEON S., RAMIRO R., ARROYO M., DIEZ R., USERA M.A. & ECHEITA M.A. (2007). Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. *Res. Microbiol.*, **158**, 122–127.

20. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) (1996). ISO 7218 Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations. International Organization for Standardization, 1, rue de Varembé, Case postale 56 CH-1211 Geneva 20, Switzerland.
21. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) (1999). ISO 6887-1: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. International Organization for Standardization, 1, rue de Varembé, Case postale 56 CH-1211 Geneva 20, Switzerland.
22. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) (2002). ISO 6579: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization, 1, rue de Varembé, Case postale 56 CH-1211 Geneva 20, Switzerland.
23. JENSEN A.N. & HOORFAR J. (2003). Optimal purification and sensitive quantification of DNA from fecal samples. *J. Rapid Meth. Automat. Microbiol.*, **10**, 231–244.
24. JUDICIAL COMMISSION OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATICS OF PROKARYOTES (2005). The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2T, and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 519–520.
25. KINDE H., CASTELLAN D.M., KASS P.H., ARDANS A., CUTLER G., BREITMEYER R.E., BELL D.D., ERNST R.A., KERR D.C., LITTLE H.E., WILLOUGHBY D., RIEMANN H.P., SNOWDON J.A. & KUNEY D.R. (2004). The occurrence and distribution of *Salmonella enteritidis* and other serovars on California egg laying premises: a comparison of two sampling methods and two culturing techniques. *Avian Dis.*, **48**, 590–594.
26. KO W.-C., YAN J.-J., YU W.-L., LEE H.-C., LEE N.-Y., WANG L.-R. & CHUANG Y.-C. (2005). A new therapeutic challenge for old pathogens: community-acquired invasive infections caused by ceftriaxone- and ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serotype choleraesuis. *Clin. Infect. Dis.*, **40**, 315–318.
27. LE MINOR L. & POPOFF M.Y. (1987). Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. nom. rev. as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**, 465–468.
28. LINDBERG A.A. & LE MINOR L. (1984). Serology of *Salmonella*. In: *Methods in Microbiology*, Vol. 15, Bergman T.E., ed. Academic Press London, UK, 1–14.
29. 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.
30. MALORNY B., HOORFAR J., BUNGE C. & HELMUTH R. (2003). Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 290–296.
31. MALORNY B., PACCASSONI E., FACH P., BUNGE C., MARTIN A. & HELMUTH R. (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 7046–7052.
32. MALORNY B., SCHROETER A., BUNGE C., HOOG B., STEINBECK A. & HELMUTH R. (2000). Evaluation of molecular typing methods for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated in Germany from healthy pigs. *Vet. Res.*, **32**, 119–129.
33. MASTROENI P., CHABALGOITY J.A., DUNSTAN S.J., MASKELL D.J. & DOUGAN G. (2001). *Salmonella*: Immune responses and vaccines. *Vet. J.*, **161**, 132–164.
34. MEAD G.C. (2000). Prospects for competitive exclusion treatment to control *Salmonellas* and other foodborne pathogens in poultry. *Vet. J.*, **159**, 111–123.
35. MOOIJMAN K.A. (2004). The use of semi-solid media for the detection of *Salmonella* spp. in poultry faeces and other matrices. Working document ISO/TC34 SC9 N681 – annex 1, 17.12.204.
36. NIELSEN B., EKEROTH L., BAGER F. & LIND P. (1998). Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of *Salmonella* infection in slaughter pig herds. *J. Vet. Diagnostic Investigation*, **10**, 158–163.
37. OLIVEIRA S.D., RODENBUSCH M.C. CE, 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.

38. OLSEN E.V., PATHIRANA S.T., SAMOYLOV A.M., BARBAREE J.M., CHIN B.A., NEELY W.C. & VODYANOV V. (2003). Specific and selective biosensor for *Salmonella* and its detection in the environment. *J. Microbiol. Methods*, **53**, 273–285.
39. PEPLOW M.O., CORREA-PRISANT M., STEBBINS M.E., JONES F. & DAVIES P. (1999). Sensitivity, specificity, and predictive values of three *Salmonella* rapid detection kits using fresh and frozen poultry environmental samples versus those of standard plating. *App. Environ. Microbiol.*, **65**, 1055–1060.
40. PERELLE S., DILASSER F., MALORNY B., GROUT J., HOORFAR J. & FACH P. (2004). Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples. *Mol. Cell. Probes*, **18**, 409–420.
41. PIKNOVA L., KACLIKOVA E., PANGALLO D., POLEK B. & KUCHTA T. (2005). Quantification of *Salmonella* by 5'-nuclease real-time polymerase chain reaction targeted to fimC gene. *Curr. Microbiol.*, **50**, 38–42.
42. POPOFF M.Y. (2001). Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Pasteur Institute, Paris, France.
43. POPPE C., MARTIN L.C., GYLES C.L., REID-SMITH R., BOERLIN P., MCEWEN S.A., PRESCOTT J.F. & FORWARD K.R. (2005). Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport and *Escherichia coli* in the turkey poult intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1184–1192.
44. PORWOLLIK S., BOYD E.F., CHOY C., CHENG P., FLOREA L., PROCTOR E. & MCCLELLAND M. (2004). Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *J. Bacteriol.*, **186**, 5883–5898.
45. RAMISSE V., HOUSSU P., HERNANDEZ E., DENOEUDE F., HILAIRE V., LISANTI O., RAMISSE F., CAVALLO J.-D. & VERGNAUD G. (2004). Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* for typing purposes. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5722–5730.
46. REISSBRODT R. (1995). Conventional and alternative methods for isolation and identification of *Salmonella* – an overview. *Biotech Bull.*, **5**, 143–156.
47. REVOLLEDO L., FERREIRA A.J.P. & MEAD G.C. (2006). Prospects in *Salmonella* control: competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. *J. Appl. Poult. Res.*, **15**, 341–351.
48. RICKE S.C., PILLAI S.D., NORTON R.A. & MACIOROWSKI K.G. (1998). Applicability of rapid methods for detection of *Salmonella* spp. in poultry feeds: a review. *J. Rapid Meth. Automat. Microbiol.*, **6**, 239–258.
49. RIJPEHS N.P. & HERMAN L.M.F. (2002). Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. *J AOAC Int.*, **85**, 984–995.
50. SHELOBOLINA E.S., SULLIVAN S.A., O'NEILL K.R., NEVIN K.P. & LOVLEY D.R. (2004). Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-Resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 2959–2965.
51. SNOEYENBOS G.H. (1994). Avian salmonellosis. In: Handbook of Zoonoses, Second Edition, Beran G.W., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
52. SWAMINATHAN B. & FENG P. (1994). Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, **48**, 410–426.
53. THRELFALL E.J. & FROST J.A. (1990). The identification, typing and fingerprinting of salmonellae: laboratory aspects and epidemiological applications. *J. Appl. Bacteriol.*, **68**, 5–16.
54. TINDALL B.J., GRIMONT P.A., GARRITY G.M. & EUZÉBY J.P. (2005) Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 521–524.
55. TORPDAHL M. & AHRENS P. (2004). Population structure of *Salmonella* investigated by amplified fragment length polymorphism. *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 566–573.
56. TORPDAHL M., SORENSSEN G., LINDSTEDT B.-A. & NIELSEN E.M. (2007). Tandem repeat analysis for surveillance of human *Salmonella* Typhimurium infections. *Emerg. Infect. Dis.*, **13**, 388–395.

57. VAN DER ZEE, H. & HUIS IN'T VELD J.H.J. (2000). Methods for the rapid detection of *Salmonella*. *Salmonella* in Domestic Animals, Wray C. & Wray A., eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 373–391.
58. VAN ZIJDERVELD F.G., VAN ZIJDERVELD-VAN BEMMEL A.M. & ANAKOTTA J. (1992). Comparison of four different enzyme-linked immunosorbent assays for serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infections in experimentally infected chickens. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2560–2566.
59. VOOGT N., RAES M., WANNET W.J.B., HENKEN N.M. & VAN DE GIESSEN A.W. (2001). Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. *Lett. Appl. Microbiol.*, **32**, 89–92.
60. WALLIS T.S. (2004). Vaccination against *Salmonella*, enterohaemorrhagic *E. coli* and *Campylobacter* in food-producing animals. *Dev. Biol. Stand. (Basel)*, **119**, 343–350.
61. WEILL F.-X., LAILLER R., PRAUD K., KEROUANTON A., FABRE L., BRISABOIS A., GRIMONT P.A.D. & CLOECKAERT A. (2004). Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5767–5773.
62. WESTPHAL O. & LUDERITZ O. (1954). Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. *Angew. Chem.*, **66**, 407–417.
63. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1994). Guidelines on Detection and Monitoring of *Salmonella* Infected Poultry Flocks with Particular Reference to *Salmonella enteritidis*, Wray C. & Davies R.H., eds. WHO, Geneva, Switzerland.
64. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) REGIONAL OFFICE FOR EUROPE (2000). WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. Seventh Report on Surveillance of Foodborne Disease in Europe 1993–1998. Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine BGVV. FAO/WHO Collaborating Centre for Training and Research in Food Hygiene and Zoonoses, P.O. Box 33 00 13, 14191 Berlin, Germany.
65. WRAY C. & WRAY A., EDS (2000). *Salmonella* in Domestic Animals. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
66. www.aoac.org/testkits/testedmethods.html (Accessed: 20/06/05)

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour les Salmonelloses (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).

TOXOPLASMOSE

RÉSUMÉ

Définition et description de la maladie : la toxoplasmose est une infection zoonotique des animaux causée par un protozoaire parasite : Toxoplasma gondii. Ce parasite est capable d'infecter tous les animaux à sang chaud ; bien que l'infection n'entraîne pas une maladie clinique dans la plupart des espèces, chez certaines elle se traduit par une maladie aiguë qui peut mettre en danger la vie de l'animal et, chez d'autres espèces, notamment les moutons et les chèvres, elle entraîne une maladie de la gestation, le parasite se multipliant dans le placenta et dans le fœtus. Chez ces animaux, la toxoplasmose cause des avortements ou la naissance d'agneaux/chevreaux faibles, qui peut s'accompagner de fœtus momifiés. Typiquement, les membranes intercotylédonaires sont normales mais de petits foyers de nécrose, d'environ 2 à 3 mm de diamètre, peuvent être visibles dans les cotylédons. Microscopiquement, ces foyers apparaissent comme des zones de nécrose libre de toute inflammation. L'inflammation, quand elle est présente, n'est pas suppurée. Les tachyzoïtes de Toxoplasma ne sont vus que rarement en association avec des foyers, habituellement en périphérie des lésions. L'examen de l'encéphale peut révéler une microgliose focale. Ces lésions ont souvent un petit foyer central de nécrose qui peut être calcifié. Une leucomalacie focale dans la substance grise cérébrale, due à l'anoxie provenant de l'atteinte placentaire est souvent présente. La microgliose focale est plus spécifique que la leucomalacie, laquelle reflète des dommages placentaires, mais peut aussi se produire dans d'autres états pathologiques dans lesquels le placenta est impliqué, y compris, bien que rarement, lors d'une chlamydiose ovine. L'infection chez le porc peut provoquer des pertes sévères chez la truie gestante mais est habituellement modérée et pas remarquée. Des infections aiguës souvent mortelles affectent les singes du Nouveau Monde, les marsupiaux et certains autres animaux.

Identification de l'agent pathogène : le toxoplasme est un parasite intra-cellulaire obligatoire qui présente un cycle sexué chez les félinés et un cycle asexué à deux temps chez tous les animaux à sang chaud. Il comprend, en général, 3 lignées (I, II et III). Dans la phase aiguë d'infection, les tachyzoïtes se multiplient dans les cellules entraînant une destruction tissulaire plus ou moins importante, et dans les cas mortels, les tachyzoïtes peuvent être mis en évidence dans le liquide d'ascite ou dans des empreintes de tissu pulmonaire. Quand la réponse immunitaire débute, les tachyzoïtes se transforment en bradyzoïtes qui se multiplient lentement dans les cellules pour donner naissance à des kystes. Chez les brebis, les chèvres et les truies qui ont avorté, T. gondii est souvent difficile à trouver dans les coupes tissulaires, mais il est plus souvent visible dans les coupes d'encéphale et de placenta. Son identité peut être confirmée par immunohistochimie, alors que l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) peut être utilisée pour identifier l'ADN du parasite dans les tissus. L'isolement du toxoplasme à partir de prélèvements est coûteux et lent, mais, si nécessaire, le mieux est l'inoculation à la souris de broyat de tissu provenant de l'encéphale fœtal ou du placenta. Le cycle sexué du parasite se déroule exclusivement dans les cellules épithéliales de l'intestin des félins et peut entraîner l'excrétion d'un très grand nombre d'oocystes dans les fèces. Les oocystes peuvent survivre pendant des mois dans le milieu extérieur.

Épreuves sérologiques : le dye test (DT) est la méthode sérologique la plus ancienne et de plusieurs façons, représente le « gold standard », au moins chez l'homme. Le DT utilise des tachyzoïtes de toxoplasme virulent, un facteur accessoire comparable au complément et le sérum à

tester. Quand des anticorps spécifiques agissent sur les tachyzoïtes, ces derniers ne se colorent pas uniformément avec le bleu de méthylène alcalin. Le test n'est pas fiable chez toutes les espèces. En outre, comme on utilise des toxoplasmes vivants, ce test présente un risque potentiel d'infection humaine et est cher à réaliser. L'immunofluorescence indirecte (IFI) donne des titres comparables au DT, mais il est plus sûr puisqu'il utilise des tachyzoïtes tués. L'épreuve d'IFI peut être utilisée pour différencier les IgG et les IgM. Le test d'agglutination directe et le test d'agglutination au latex sont tous les deux relativement rapides et ne nécessitent pas de matériels de laboratoire compliqués. La méthode immuno-enzymatique (ELISA) nécessite des équipements plus sophistiqués mais peut traiter de grandes quantités de sérums et n'est pas liée à une interprétation humaine pour la lecture du résultat.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : un vaccin composé de tachyzoïtes vivants est disponible commercialement pour utilisation chez le mouton dans certains pays européens et en Nouvelle-Zélande. Le vaccin est présenté comme une suspension concentrée de tachyzoïtes associé à un système de délivrance. Le vaccin doit être strictement maintenu et manipulé selon les recommandations du fabricant car il a une brève durée de vie.

A. INTRODUCTION

Toxoplasma gondii est un protozoaire parasite intracellulaire obligatoire qui a aussi un potentiel zoonotique. Il est capable d'infecter tous les animaux à sang chaud ; bien que l'infection n'entraîne pas de maladie clinique dans la plupart des espèces, chez certaines elle se traduit par une maladie aiguë qui peut mettre en danger la vie de l'animal et, chez d'autres espèces, notamment les moutons et les chèvres, elle entraîne une maladie de la gestation, le parasite se multipliant dans le placenta et dans le fœtus. Des cas aigus pouvant être fatals sont signalés sur des singes du Nouveau Monde (8), des marsupiaux (6), et sur certains autres animaux (voir ci-dessous). Dans ces cas, les symptômes peuvent comprendre une lymphadénopathie, une hépatomégalie, une pneumonie interstitielle et des signes nerveux. À l'autopsie, les nœuds lymphatiques, la rate et le foie peuvent apparaître hypertrophiés et le foie notamment peut présenter des foyers de décoloration. Chez les moutons, les chèvres et les porcs, une infection primaire contractée pendant la gestation peut résulter en une infertilité apparente, ou de la mortinatalité et des avortements, selon le stade de la gestation au cours duquel l'infection a commencé. Dans le cas typique d'un avortement, une brebis ou une chèvre infectée en milieu de gestation produira un agneau/cheveau mort-né quelques jours avant la fin prévue de la gestation. Le fœtus avorté est souvent accompagné soit d'un autre fœtus faible ou d'un fœtus momifié (5). La brebis/chèvre reste cliniquement normale. Dans de tels cas, les cotylédons placentaires sont typiquement tachetés par des foyers blanchâtres d'environ 2 à 3 mm de diamètre alors que les membranes intercotylédonaires apparaissent normales. L'infection en début de gestation, quand le fœtus n'a qu'un système immunitaire rudimentaire, aboutit à la mort fœtale et sa résorption. Dans ce cas, la mère apparaît comme stérile ce qui peut mimer un problème d'infertilité du troupeau. Les mères qui sont infectées en fin de gestation donnent a priori une descendance infectée mais normale cliniquement. À la suite d'une infection, soit durant soit en dehors d'une gestation, le parasite n'est pas incriminé dans les avortements des gestations suivantes. Bien que certaines recherches récentes remettent en question cette conclusion (13, 38), l'opinion générale actuellement est que la recrudescence d'une infection persistante pendant la gestation n'entraîne pas normalement des avortements à répétition (28). L'infection chez le porc peut provoquer des pertes sévères chez la truie gestante, mais dans les conditions d'élevage intensif avec une contamination minimale, voire nulle, des bâtiments et de la nourriture par les oocystes de *T. gondii*, on peut estimer que l'infection évolue avec une faible incidence et est plus souvent modérée ou pas remarquée (24). Cependant, quand les porcs sont élevés en plein air dans des systèmes extensifs, ils ont plus de risques d'entrer en contact avec des oocystes et l'infection est plus fréquente (21).

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire qui présente un cycle asexué à deux temps chez tous les animaux à sang chaud et un cycle sexué chez les félinés. Les souches de toxoplasme sont réparties en 3 lignées clonales (I, II et III), les lignées II et III étant associées à la maladie chez les animaux, alors que la lignée I prédomine lors de la maladie chez l'homme (17, 20). Dans la phase asexuée, deux stades de développement existent : le tachyzoïte à multiplication rapide et le bradyzoïte à multiplication lente. Au cours des infections aiguës, les tachyzoïtes pénètrent activement les cellules de l'hôte dans lesquelles ils se multiplient causant la rupture de la cellule, libérant les parasites localement et dans la circulation. Lorsque l'hôte développe une immunité, le parasite garde ses dimensions et sa forme mais se transforme en stade bradyzoïte, se multiplie plus lentement à l'intérieur de kyste tissulaire établissant une infection permanente. Ces kystes tissulaires microscopiques sont présents la plupart du temps dans l'encéphale et les muscles squelettiques et représentent le stade quiescent du parasite chez l'hôte. Les kystes tissulaires vivants au sein des muscles (viande) sont une source importante d'infection humaine. Chez les animaux qui succombent à une infection aiguë, les tachyzoïtes

peuvent être mis en évidence dans le liquide d'ascite ou sur des empreintes de poumons ainsi que sur des coupes de foie et d'autres organes affectés.

La phase sexuée se déroule dans les cellules épithéliales intestinales du chat hôte définitif et aboutit à la production d'oocystes de *Toxoplasma*. À la suite d'une infection primaire chez un chat, les oocystes peuvent être éliminés dans les fèces durant plusieurs jours. Les oocystes sporulent dans le milieu extérieur en 1 à 5 jours (selon l'oxygénation, l'humidité et la température) au terme desquels l'oocyste devient infectant. Ils sont très résistants et peuvent rester infectants dans le milieu une année ou plus. Les oocystes sporulés sont de $11 \times 13 \mu\text{m}$ de diamètre et chacun contient 4 sporozoïtes dans chacun des 2 sporocystes (11). Quand un animal sensible ingère des oocystes sporulés, les sporozoïtes pénètrent la paroi intestinale, se transforment en tachyzoïtes et établissent une infection.

Chez le mouton, la chèvre, le porc, le cheval et l'homme, les kystes tissulaires persistent pour le reste de la vie du sujet (11). Le toxoplasme ne provoque pas habituellement de maladie clinique chez les bovins, les camélidés et les cervidés, mais peut provoquer une maladie fatale chez les singes du Nouveau Monde, les marsupiaux, et certains autres animaux tels que les lièvres (*Lepus europaeus*, *L. timidus*) (16), le chat de Pallas (2), le renard de l'Arctique (32), certains oiseaux (12) et certains mammifères marins (15). On peut penser que ces animaux, ainsi que d'autres infectés de façon semblable, ont été en contact au cours des temps avec *T. gondii* dans leur environnement naturel, ce qui les auraient rendus plus vulnérables au parasite.

L'avortement dû à *T. gondii* chez le mouton et la chèvre peut être distingué de celui causé par d'autres agents infectieux, y compris les infections à *Chlamydophila abortus* (cf. Chapitre 2.7.7., « Avortement enzootique des brebis [chlamydiose ovine] »), *Coxiella burnetii* (cf. Chapitre 2.1.12., « Fièvre Q »), *Brucella melitensis* (cf. Chapitre 2.7.2., « Brucellose ovine et caprine [Infection à *Brucella ovis* exclue] »), *Campylobacter fetus fetus* (cf. Chapitre 2.7.1., « Maladie de la frontière ["Border Disease"] ») et les virus qui causent la bluetongue, la maladie de Wesselsbron et la maladie d'Akabane. Chez le porc, *Brucella suis* (cf. Chapitre 2.8.5.) peut aussi causer une mort fœtale, une momification et des avortements.

• Risques pour la santé humaine

Toxoplasma gondii infecte l'homme et alors que l'infection est assez commune (approximativement 30 % de la population selon l'âge et l'environnement), la maladie clinique est assez rare. Les individus présentant un risque important de développer une maladie clinique regroupent la femme enceinte, parce que le parasite peut constituer, chez les mères infectées pour la première fois, une menace sérieuse pour l'enfant avant la naissance, et les individus qui sont immunodéprimés tels les transplantés, les patients du SIDA, ceux souffrant de certains cancers et ceux recevant certaine thérapeutique anticancéreuse. Ces patients risquent de développer une infection aiguë mortelle en l'absence de traitement. Les sujets très jeunes et âgés sont également très sensibles. Eventuellement les sujets sans immunodéficience apparente peuvent développer une maladie caractérisée par un affaiblissement général, de la fièvre et une lymphadénopathie. Les sources d'infection humaine sont l'ingestion de viande crue ou faiblement cuite contenant des kystes tissulaires de *T. gondii*, l'ingestion de légumes crus ou légèrement cuits contaminés par des oocystes ou l'exposition à des oocystes provenant de fèces de chat, comme cela se produit dans les jardins et les bacs à sable. La toxoplasmose est maintenant considérée comme une zoonose d'origine hydrique (10). Ce mode de transmission est possible quand le traitement de l'eau est inefficace ou absent, et qu'il existe localement une population de chats de taille suffisante pour contaminer l'eau avec des oocystes (1, 10). Associé à ce mode de transmission, est l'opinion que les mammifères marins peuvent s'infecter dans des eaux souillées par de la terre contaminée ou les effluents d'égouts de ville non traités (15).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

a) Isolement

Le mieux pour l'isolement du toxoplasme *T. gondii* à partir de fœtus issus d'avortements ovins et caprins et de membranes fœtales est l'inoculation à la souris de laboratoire. Les meilleurs tissus pour l'inoculation sont l'encéphale fœtal et les cotylédons placentaires, et les résultats optimaux sont obtenus avec des échantillons frais et exempts de toute contamination. À aucun moment, les échantillons ne doivent être refroidis car cela tue le parasite.

- i) Récolter aseptiquement 2 à 5 g de cotylédons placentaires ou de tissu cérébral provenant du fœtus avorté ;

- ii) Homogénéiser le tissu en volumes égaux de 0,3 M de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,4, additionné d'antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline et 745 UI/ml de streptomycine) dans un « stomacher » (Seward Laboratory, Londres) ou tout équipement fiable d'homogénéisation. Le tissu cérébral peut être effectivement homogénéisé en le passant à l'aide d'une seringue 10 fois dans une aiguille de calibre 16 G ;
- iii) Inoculer 0,5 ml du mélange homogène par voie intrapéritonéale à 3 souris indemnes de toxoplasmose ;
- iv) Tuer les souris 6 à 8 semaines après l'inoculation et recueillir les encéphales. Le sang doit également être recueilli à ce stade et le sérum préparé et conservé à -20 °C. Les encéphales des souris qui meurent avant les 6 à 8 semaines doivent aussi être prélevés ;
- v) Homogénéiser chaque encéphale de souris dans un volume équivalent de PBS stérile en le passant 10 fois dans une aiguille de 16 G à l'aide d'une seringue ;
- vi) Déposer une goutte (5 µl) de la suspension donnée sur 5 lames ;
- vii) Sécher et colorer avec le Giemsa, sécher et mettre une lamelle ;
- viii) Examiner les lames au microscope. Les kystes tissulaires apparaissent comme des structures circulaires mesurant 5 à 50 µm colorés en bleu, avec des bradyzoïtes en croissant.

Une autre méthode pour l'examen de l'encéphale de souris est de prendre une petite portion du prosencéphale (approximativement de la dimension d'une tête d'allumette) écrasée avec la lamelle. Les kystes tissulaires peuvent aisément être observés au microscope.

Si les tissus inoculés sont fortement infectés par *T. gondii*, les souris meurent en 1 à 2 semaines.

Un échec lors d'une tentative pour mettre en évidence des kystes tissulaires ne doit pas faire exclure un diagnostic positif. Le sérum des souris doit être analysé pour la recherche d'anticorps à *T. gondii* (par exemple par l'IFI) et si l'analyse est également négative, l'infection toxoplasmique est peu vraisemblable.

b) Coupes histologiques

Chez les animaux qui succombent à une toxoplasmose aiguë, des foyers d'inflammation mononucléaire associés ou non à des foyers de nécrose peuvent être observés dans un grand nombre de tissus, notamment le foie, le cœur et les poumons. Ceux-ci peuvent être oedémateux. Les nœuds lymphatiques sont hypertrophiés avec ou non des foyers de nécrose et des hémorragies. Classiquement, les tachyzoïtes de *Toxoplasma* sont mis en évidence associés à la nécrose et à l'inflammation.

Lors d'avortements ou de mortalité chez les brebis et les chèvres, de grands foyers typiques de nécrose qui peuvent se calcifier au cours du temps sont visibles dans les cotylédons placentaires affectés. Toute l'inflammation associée est classiquement modérée et non suppurée. Les échantillons bien conservés de cotylédons du placenta peuvent montrer un oedème modéré du mésenchyme des villosités fœtales, avec une hypercellularité diffuse due à la présence de cellules mononucléées. Parfois, de petites quantités de toxoplasmes intra- et extracellulaires sont visibles, habituellement en périphérie de zones nécrosées ou dans une villosité ce qui constitue les stades précoces de l'infection. Les tachyzoïtes de toxoplasmose apparaissent ovoïdes, de 2 à 6 µm de longueur, avec des noyaux modérément basophiles, centraux ou à proximité de l'extrémité postérieure.

Dans l'encéphale du fœtus, des lésions primaires et secondaires peuvent se développer. Des foyers de microglie, typiquement avec un centre nécrosé et parfois calcifié et souvent associé à une méningite lymphoïde modérée représente une réponse immunitaire fœtale postérieure aux lésions provoquées par la multiplication du parasite. Les kystes tissulaires de *Toxoplasma* ne sont que rarement observés, habituellement en périphérie des lésions. Une leucomalacie focale est aussi fréquente et est considérée comme la conséquence d'une anoxie fœtale causée par des lésions évoluées du placenta interdisant le transfert de l'oxygène de la mère au fœtus. Ces foyers sont observés le plus souvent dans les cornes de matière blanche cérébrale, mais quelquefois dans la substance grise cérébelleuse. Ces foyers de leucomalacie seuls suggèrent une atteinte placentaire ou une insuffisance aiguë, mais les deux modifications neuropathologiques, vues ensemble, sont caractéristiques de l'infection toxoplasmique. La confirmation de l'identité de structures ressemblant au toxoplasme dans des coupes histologiques, peut être réalisée par immunohistochimie qui marque le toxoplasme intact ou des traces antigéniques. La technique est à la fois commode et sensible ; elle est utilisée sur des tissus fixés (y compris des tissus anciens) qui peuvent présenter un haut degré de décomposition où l'isolement n'est ni approprié ni possible. La méthode d'immunoperoxydase indirecte à ABC et la technique peroxydase-antiperoxydase (PAP) (34) sont de qualité égale.

c) Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques

Plusieurs essais basés sur la PCR ont été développés pour la détection de l'ADN de *T. gondii*. Les principales régions cibles sont la séquence répétée B1 (3), le gène P30 (SAG1) (31) et l'ARN ribosomal 18S (ARNr) (14). La sensibilité de la PCR dépend du nombre de copies de la séquence cible (P30 : 1 copie, B1 : 35 copies, ARNr : 110 unités répétées). Des oligonucléotides synthétiques d'ADN sont disponibles commercialement (ex. www.sigma-genosys.co.uk). Des oligonucléotides synthétiques d'ADN sont disponibles commercialement (ex. www.sigma-genosys.co.uk). La méthode d'amplification de la séquence répétitive B1 a été récemment utilisée pour analyser les produits d'aspiration chez des patients humains atteints de cataracte congénitalement infectés (25) et elle s'est révélée plus sensible que la méthode conventionnelle (épreuve immuno-enzymatique [ELISA]). Cependant, bien que la PCR soit très sensible, des précautions doivent être prises si c'est le seul test mis en œuvre ; dans de nombreux cas un diagnostic plus fiable sera obtenu si elle est associée à d'autres éléments diagnostiques.

Récemment, une PCR en temps réel a été mise au point afin de permettre en même temps l'amplification et la quantification de l'ADN. Elle est semblable aux méthodes de PCR existantes et peut être réalisée dans des plaques de microtitrage à 96 puits. Après chaque cycle d'amplification, des molécules de colorants fluorescents s'intercalent avec l'ADN double brin ce qui permet la quantification de l'ADN du parasite présent dans l'échantillon. La PCR en temps réel a été utilisée pour amplifier et quantifier le gène B1 de *T. gondii* (7, 23). Cette quantification de l'ADN permet de déterminer le nombre des parasites présents dans les tissus et les liquides tels que le liquide amniotique de patients soupçonnés d'être congénitalement infectés par *T. gondii* (27). La PCR en temps réel est hautement spécifique et sensible, mais elle est coûteuse et nécessite des systèmes de détection spécialisés ; de ce fait, elle n'est rentable que dans les laboratoires qui analysent un grand nombre d'échantillons.

La méthode qui est décrite ci-dessous, est une PCR nichée, amplifiant la séquence répétée B1 d'ADN (36). L'ADN parasite peut être extrait et purifié à partir de plusieurs tissus, y compris le placenta, le système nerveux central, le cœur et le muscle strié.

Les globules rouges contaminant les tissus peuvent être éliminés en lavant ceux-ci dans du tampon 10 mM Tris/NH₄Cl pH 7,6, avant une centrifugation à 2 000 *g* pendant 15 min. L'ADN est extrait du culot et remis en suspension dans du tampon 10 mM Tris, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ contenant la protéinase K 100 µg/ml et 0,5 % de Tween 20.

Les échantillons sont incubés à 55 °C pendant au moins 1 h, puis la protéinase K est inactivée par ébullition. La PCR est réalisée dans des volumes de 50 µl. L'amplification des gènes B1 est réalisée en modifiant la procédure décrite en réf. 1. Le mélange réactif renferme 10 mM Tris, pH 8,3, 2,5 mM de MgCl₂, 40 mM de KCl, 0,01 % de gélatine, 0,1 mM de dNTPs, 0,2 µM de chaque amorce (les amorces oligonucléotidiques sont celles qui sont décrites en réf. 1), 2 amorces P1 et P2 et 2 amorces anti-sens P3 et P4 et 2,5 unités de Taq polymérase.

L'amplification première est réalisée avec des amorces 1 et 4 et donne un produit de 193 pb sur 25 cycles à 93 °C pendant 1 min, 50 °C pendant 1,5 min et 72 °C pendant 3 min. Le produit amplifié est dilué au 1/20 dans l'eau distillée pour réduire l'amplification de produits non spécifiques.

L'amplification seconde utilisant les amorces cachées 2 et 3 et les mêmes conditions de réaction, est fondée sur 15 cycles et donne un produit de 94 pb. Le produit final est visualisé sur gel d'agarose à 1 %. La technique de « southern blotting » en utilisant une sonde marquée peut être utilisée pour confirmer l'identité des produits de la PCR B1 et les distinguer des produits non spécifiques.

d) Détection des oocystes dans l'eau de boisson

Des oocystes de *Toxoplasma gondii* ont été détectés dans de l'eau de boisson par la méthode de détection des oocystes de *Cryptosporidium* (18). La méthode repose sur la collecte d'un grand volume d'eau et de son passage sur un filtre. L'identification des oocystes de *Toxoplasma* a été réalisée par inoculation à des rongeurs.

2. Épreuves sérologiques

Il existe plusieurs épreuves sérologiques pour la détection des anticorps contre *T. gondii*. Lors d'une épreuve, l'examineur observe la couleur des tachyzoïtes au microscope, comme dans le dye test (DT) ou l'IFI. D'autres dépendent du principe de l'agglutination des tachyzoïtes de *Toxoplasma*, de globules rouges ou de particules de latex comme dans les cas respectifs de l'agglutination directe (DAT), de l'hémagglutination indirecte (HAI) et de l'agglutination au latex (LA). Avec la méthode immuno-enzymatique (ELISA), l'intensité de la couleur définit la quantité d'anticorps présents dans une solution donnée. Le DT, IFI, DAT et ELISA sont exposés ci-dessous, avec plus de détails en ce qui concerne l'IFI.

Le DT (29) est également appelé l'épreuve sérologique « gold standard » (de référence) pour la détection des anticorps *T. gondii* chez l'homme. Des tachyzoïtes vivants de toxoplasme sont incubés avec un facteur accessoire type complément et le sérum à tester à 37 °C pendant 1 h avant d'ajouter le bleu de méthylène. Les anticorps spécifiques entraînent la perméabilité membranaire du parasite telle que le cytoplasme peut s'échapper ; le tachyzoïte ne peut incorporer le colorant et il apparaît ainsi incolore. Les tachyzoïtes non exposés à l'action des anticorps spécifiques (c'est-à-dire d'un sérum négatif) prennent le colorant et deviennent bleus. Le DT est à la fois sensible et spécifique chez l'homme, mais peut être non fiable chez d'autres espèces. En outre, il est potentiellement risqué puisque l'on utilise des parasites vivants. Il est coûteux et requiert un haut niveau d'expertise technique. Du fait des considérations liées au bien être animal, il est recommandé, quand c'est possible, de multiplier les tachyzoïtes sur cultures cellulaires plutôt que sur péritoine de souris.

L'IFI (26) est une méthode simple et largement utilisée. Des tachyzoïtes entiers et tués de toxoplasme sont incubés avec le sérum dilué à tester, le sérum fluorescent spécifique de l'espèce ajouté et le résultat est observé au microscope à fluorescence. Les anticorps marqués à la fluorescéine sont disponibles commercialement pour une variété d'espèces animales ; la méthode est relativement peu coûteuse et des kits de diagnostic sont disponibles dans le commerce. Néanmoins la méthode nécessite un microscope à fluorescence et les résultats sont lus à l'œil, aussi peut-il exister une variation individuelle. Il peut être difficile de trouver les conjugués spécifiques et il existe un risque de réactivité croisée avec le facteur rhumatoïde et les anticorps antinucléaires.

La DAT (9) est sensible et spécifique. Des tachyzoïtes formolés de toxoplasme sont versés dans des puits en forme de U sur des plaques et les dilutions du sérum à tester préparées. Les échantillons positifs produiront une agglutination qui peut être mesurée, alors que les échantillons négatifs produiront un « culot » de tachyzoïtes précipités dans le fond du puits. Le test est simple et facile à réaliser bien que de grandes quantités d'antigène soient nécessaires. Des kits de diagnostic sont disponibles dans le commerce. La méthode d'obtention des parasites est donnée ci-dessous. Un test d'agglutination au latex (LAT) est disponible dans le commerce. Le DAT et le LAT ne sont pas spécifiques d'espèce et peuvent être utilisés pour toutes les espèces.

L'ELISA (35) utilise une préparation soluble d'antigènes provenant de tachyzoïtes de la souche RH (décrite ci-dessous) et déposés dans les puits d'une microplaque. Le sérum à tester (ex. d'origine ovine) est ajouté, suivi par le conjugué spécifique couplé à une enzyme comme l'IgG anti-mouton couplé à la peroxydase de raifort. Tout conjugué fixé provoque un changement de couleur du substrat qui est directement en relation avec la quantité d'anticorps fixés, et qui peut être lue avec un spectrophotomètre pour l'absorption spécifique du substrat utilisé. Le test est simple, permet de tester facilement un grand nombre d'échantillons et est aisé à réaliser avec le conjugué spécifique choisi. Des conjugués spécifiques, les substrats et des kits de diagnostic entiers sont commercialisés. Néanmoins, le test nécessite un spectrophotomètre. L'ELISA convient bien aux laboratoires choisis pour traiter de grands nombres d'échantillons.

Un test ELISA cinétique (KELA pour *kinetics ELISA*) a été mis au point récemment (37). Le système KELA permet de mesurer le taux de réaction entre l'enzyme liée et la solution substrat qui mène à la coloration. Trois densités optiques (DO) sont lues à 45 s d'intervalle (en utilisant le programme de gestion des données du KELA) et les résultats sont donnés sous forme de pentes. La corrélation entre le KELA et l'ELISA est très bonne et les deux tests sont donc de très bons outils pour le diagnostic, la seule différence étant l'aspect pratique de leur réalisation.

Pour améliorer la spécificité de l'ELISA conventionnel, des tests utilisant des antigènes recombinants (19) ou des antigènes spécifiques de *Toxoplasma* purifiés pour une haute affinité (22) ont été développés pour être employés chez les moutons (30, 33) mais ces tests ne sont pas encore utilisés en routine.

Avec l'ELISA conventionnel, la détection des IgG et IgM spécifiques de *Toxoplasma* permet de distinguer entre une toxoplasmose aiguë et une toxoplasmose chronique. Récemment, des tests basés sur l'avidité ont été mis au point. Comme la réponse immunitaire se modifie une fois l'infection établie, les anticorps présentent une avidité croissante (affinité fonctionnelle) pour l'antigène. Cette avidité peut être mesurée et permet d'indiquer s'il s'agit d'une infection active ou récente par *T. gondii*. Un test pour la détection chez les moutons de l'avidité des IgG pour l'antigène P30 de *T. gondii* a été mis au point (30). Ce test est un bon outil diagnostique pour distinguer des infections relativement récentes de celles plus anciennes.

- **Préparation de l'antisérum et des antigènes**

L'antisérum de *T. gondii* et l'antisérum conjugué utilisés pour l'IFI et l'ELISA, permettant d'analyser plusieurs espèces animales, peuvent être obtenus commercialement. Des réactifs de référence internationaux pour les sérums animaux ne sont pas disponibles.

Ci-dessous sont présentés les protocoles pour la préparation des antigènes de tachyzoïte pour les tests IFI et l'ELISA. Les tachyzoïtes peuvent se multiplier chez la souris ou en culture cellulaire ; ils restent en tant que parasites entiers dans l'IFI, ou sont préparés sous forme d'antigène soluble dans l'ELISA.

- **Production de tachyzoïtes de *Toxoplasma* chez la souris**

- Injecter à 6 souris indemnes de toxoplasmes, chacune recevant 0,2 ml de 1×10^7 /ml de tachyzoïtes de *T. gondii* de la souche RH par la voie intrapéritonéale en utilisant une seringue de 1 ml et une aiguille 23 G ; les tachyzoïtes sont préparés à partir d'une souris infectée par une culture tissulaire (pour observer un optimum de tachyzoïtes dans les cellules mononuclées de l'hôte, les souris doivent être âgées de 6 à 8 semaines et peser approximativement 22 à 25 g) ;
- Tuer les souris 3 jours plus tard par inhalation de CO₂ (éviter l'élongation cervicale qui peut causer une contamination du liquide péritonéal par des globules rouges) ;
- Poser les souris sur le dos sur un morceau de liège. Nettoyer la paroi abdominale avec une solution aseptique, recueillir le liquide péritonéal par une aiguille 21 G sertie à une seringue de 1 ml et transférer l'exsudat obtenu dans un volume équivalent de PBS ;

Le délai optimal pour recueillir les tachyzoïtes est de 72 h après l'inoculation, délai suffisant pour la multiplication des parasites mais avant que la contamination par les cellules de l'hôte n'intervienne. Il est également important de ne pas dépasser 3 jours pour recueillir le liquide car au-delà la souris pourrait mourir (si les tachyzoïtes utilisés pour l'inoculation des souris proviennent d'un stabilat refroidi, il peut être nécessaire d'attendre 4 à 5 jours après l'inoculation et de passer une fois de plus le parasite sur souris avant de l'utiliser comme antigène dans les tests ci-dessous) ;

- Centrifuger le liquide à 500 **g** pendant 5 min, recueillir le surnageant et remettre en suspension dans une solution équilibrée de Hank (HBSS). Rincer par centrifugation alternativement par PBS et HBSS ;
- Calculer la concentration en tachyzoïtes et en cellules de l'hôte avec une cellule de comptage Neubauer (nombre de tachyzoïtes à la concentration de 1/1 000 et la contamination cellulaire à 1/10) ;
- Procéder à des rinçages supplémentaires (étape iv au-dessus) pour réduire la contamination cellulaire à moins de 0,5 % de cellules mononuclées et moins de 0,25 % de globules rouges ;
- Remettre en suspension les tachyzoïtes dans du PBS pour obtenir une concentration finale de 1×10^7 /ml ;
- Les tachyzoïtes peuvent être maintenus de cette façon par repiquage continu sans addition de pénicilline/streptomycine et en observant des procédures aseptiques strictes.

- **Préparation d'aliqots d'un stabilat refroidi de tachyzoïtes de *T. gondii***

- Produire les tachyzoïtes chez la souris ou en culture cellulaire comme décrit ;
- Centrifuger à 500 **g** pendant 5 min et remettre en suspension dans le milieu de Dulbecco modifié Iscove (IMDM) à peu près 3 fois (Gibco BRL, Paisley, Royaume-Uni) ;
- Ajouter les solutions suivantes pour obtenir ces concentrations : dimethyl sulphoxyde à 10 % ; sérum de cheval sain à 20 % (indemne de toxoplasme) ; tachyzoïtes remis en suspension à 70 % pour obtenir une concentration finale de 1×10^8 tachyzoïtes/ml ;
- Laisser reposer la préparation sur la paillasse pendant 1 h ;
- Distribuer dans des tubes de 1 ml fermés par un bouchon et appropriés à un stockage dans l'azote liquide ;
- Disposer les tubes dans un petit récipient, puis emballer celui-ci dans un épais matériel isolant et le placer au congélateur à -70 °C afin de permettre aux tachyzoïtes d'être refroidis de manière graduelle ;
- Le jour suivant transférer dans l'azote liquide, en conservant l'isolation du matériel transféré ;
- Ce stabilat peut être utilisé pour être inoculé à des souris ou des cultures cellulaires du parasite. Pour récupérer le matériel de l'azote liquide, le passer brutalement sous eau chaude.

- **Production de tachyzoïtes de *Toxoplasma* en culture tissulaire**

- Toxoplasma gondii* peut se multiplier et se maintenir en culture par passage 2 fois par semaine sur cellules de rein de singes verts africains (Vero) ;
- Les cellules et le parasite se développent sur milieu IMDM supplémenté avec 50 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine et du sérum de veau fœtal à 2 % ;
- Les tachyzoïtes sont prélevés des flacons de culture cellulaire en raclant la couche monocellulaire à l'aide d'un racloir à cellule stérile ;

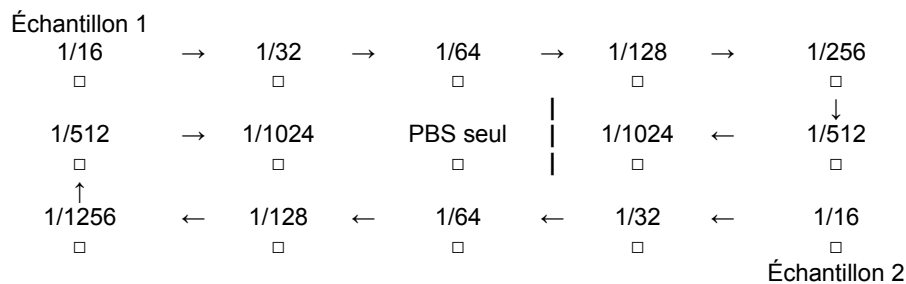
- iv) En utilisant 25 cm² de culture tissulaire dans des flacons ensemencés avec 1×10^5 cellules Vero, ajouter les tachyzoïtes à raison de 2 tachyzoïtes par cellule mononuclée et incuber à 37 °C dans une chambre humide à 5 % de CO₂. Recueillir après 3 à 4 jours.
- **Préparation de tachyzoïtes entiers pour l'utilisation en IFI**
 - i) Produire 4×10^7 /ml en suspension de tachyzoïtes de *T. gondii* de la souche RH en PBS ;
 - ii) Ajouter du formol (40 %) de manière à obtenir une concentration finale de 0,2 % (v/v) ;
 - iii) Incuber à 4 °C toute la nuit, puis diviser la suspension en autant de tubes fermés que nécessaire et les conserver congelés jusqu'à utilisation.
- **Production d'antigène soluble pour le test ELISA**
 - i) Produire une suspension de tachyzoïtes de *T. gondii* de la souche RH en PBS ;
 - ii) Centrifuger à 2 000 *g* pendant 15 min, recueillir le culot et remettre en suspension dans 9 fois son volume d'eau ;
 - iii) Casser les tachyzoïtes par congélation–décongélation 3 fois de suite ;
 - iv) La préparation antigénique est soumise à ultrasons pendant 20 s à 4 °C à une amplitude de 20 microns ;
 - v) Eliminer tout débris cellulaire par centrifugation à 10 000 *g* pendant 30 min à 4 °C ;
 - vi) Recueillir le surnageant et conserver à –20 °C jusqu'à utilisation (l'estimation en protéines doit être comprise dans une fourchette de 2 à 4 µg/ml).
- **Protocole pour l'épreuve d'IFI**

Ce qui suit est un protocole pour la détection des anticorps IgG anti-toxoplasme dans du sérum de mouton par une épreuve d'IFI. Il nécessite des modifications mineures pour tester d'autres espèces ou détecter des IgM.

- i) Nettoyer le nombre nécessaire de lames à 15 puits de culture cellulaire (Flow laboratories) et laisser sécher ;
- ii) Déposer 5 µl de préparation de tachyzoïtes entiers dans chaque puits et laisser sécher ;
- iii) Fixer au méthanol pendant 10 min ;
- iv) Laver 2 fois 10 min dans 0,3 M PBS pH 7,4 ;
- v) Ajouter 5 µl de sérum de mouton à tester (dilué en PBS) dans chaque puits (préparer les dilutions des sérums, c'est-à-dire 1/16, 1/32, etc jusqu'à 1/1024). S'assurer que les témoins positif et négatif sont inclus dans chaque essai ainsi qu'un échantillon PBS uniquement. Incuber pendant 30 min à la température de la pièce ;
- vi) Laver 2 fois 10 min en PBS ;
- vii) Ajouter 5 µl d'IgG de lapin anti-mouton à la dilution appropriée conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine, diluée dans du bleu d'Evans à 0,2 % dans du PBS, dans chaque puits et incuber 30 min à la température de la pièce ;
- viii) Laver 3 fois 10 min dans du PBS ;
- ix) Monter les lames et lamelles avec du glycérol tamponné (9 parts de glycérol pour une part de PBS) ou Citifluor (Citifluor Ltd, London) ;
- x) Examiner au microscope à fluorescence aux objectifs de $\times 20$ et $\times 40$.

Avec un sérum négatif, les parasites entiers apparaissent rouges en raison de l'autofluorescence du bleu d'Evans. Ils peuvent aussi être vus avec une fluorescence verte à un pôle du parasite (fluorescence polaire non spécifique). Avec un sérum positif, les parasites sont rouges fluorescents et au moins 80 % d'entre eux dans un puits donné sont entourés d'une bande continue de fluorescence verte. Pour un mouton ou une chèvre adulte, un sérum est considéré positif si la dilution de 1/64 au minimum est positive, et un sérum est négatif si la dilution de 1/32 au plus est positive. Pour l'agneau et chevreau et le sérum fœtal, les titres respectifs sont de 1/32 au plus et 1/16 au moins.

Un exemple est donné ci-dessous :



C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Le seul vaccin disponible est un produit vivant commercialisé pour le mouton (Toxovax, Intervet BV, Pays-Bas ; Toxovax, AgVax, Ag Research, Nouvelle-Zélande), autorisé au Royaume-Uni, en Irlande, en France, au Portugal, en Espagne et en Nouvelle-Zélande. Il consiste en une culture cellulaire de tachyzoïtes de toxoplasme S48 atténués par 3 000 passages sur souris. Le vaccin stimule une immunité efficace pour au moins 18 mois après une simple injection sous-cutanée, mais le mouton ne garde pas une infection persistante car le vaccin est incapable de produire des kystes tissulaires. Le vaccin a une durée de vie courte et présente un danger potentiel pour les sujets immunodéprimés et les manipulatrices enceintes (4). Le vaccin doit être conservé et utilisé strictement selon les recommandations du fabricant ; ainsi ne doit-il jamais être congelé, mais maintenu au frais (à 4 °C environ) et à l'abri de la lumière. Le diluant fourni avec le vaccin ne doit être ajouté à la suspension concentrée de tachyzoïtes que juste avant l'utilisation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BOWIE W.R., KING A.S., WERKER D.H., ISAAC-RENTON J.L., BELL A., ENG S.B.V. & MARION S.A. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet*, **350**, 173–177.
2. BROWN M., LAPPIN M.R., BROWN J.L., MUNKHTSOG B. & SWANSON W.F. (2005). Exploring the ecological basis for extreme susceptibility of Pallas' cats (*Otocolobus manul*) to fatal toxoplasmosis. *J. Wildlife Dis.*, **41**, 691–700.
3. BURG J.L., GROVER C.M., POULETTY P. & BOOTHROYD J.C. (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1787–1792.
4. BUXTON D. (1993). Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol. Today*, **9**, 335–337.
5. BUXTON D. (2000). Toxoplasmosis and neosporosis. *In*: Diseases of Sheep, Martin W.B. & Aitken I.D., eds. Blackwell Science, Oxford, UK, 86–94.
6. CANFIELD P.J., HARTLEY W.J. & DUBEY J.P. (1990). Lesions of toxoplasmosis in Australian marsupials. *J. Comp. Pathol.*, **103**, 159–167.
7. COSTA J.M., PAUTAS C., ERNAULT P., FOULET F., CORDONNIER C. & BRETAGNE S. (2000). Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 2929–2932.
8. CUNNINGHAM A.A., BUXTON D. & THOMSON K.M. (1992). An epidemic of toxoplasmosis in a captive colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J. Comp. Pathol.*, **107**, 207–219.
9. DESMONTS G. & REMINGTON J.S. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.*, **11**, 562–568.
10. DUBEY J.P. (2004). Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.*, **126**, 57–72.

11. DUBEY J.P. & BEATTIE C.P. (1988). Toxoplasmosis of Animals and Man. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
12. DUBEY J.P., GARNER M.W., WILLETTE M.M., BATEY K.L. & GARDINER C.H. (2001). Disseminated toxoplasmosis in magpie geese (*Anseranas semipalmata*) with large numbers of tissue cysts in livers. *J. Parasitol.*, **87**, 219–223.
13. DUNCANSON P., TERRY R.S., SMITH J.E. & HIDE G. (2001). High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int. J. Parasitol.*, **31**, 1699–1703.
14. ELLIS J.T. (1998). Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, **28**, 1053–1060.
15. FAYER R., DUBEY J.P. & LINDSAY D.S. (2004). Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends in Parasitol.*, **20**, 531–536.
16. GUSTAFSSON K. & UGGLA A. (1994). Serologic survey for *Toxoplasma gondii* infection in the brown hare (*Lepus europaeus*) in Sweden. *J. Wildlife Dis.*, **30**, 402–407.
17. HOWE D.K. & SIBLEY D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Inf. Dist.*, **172**, 1561–1566.
18. ISAAC-RENTON J., BOWIE W.R., KING A., IRWIN G.S., ONG C.S., FUNG C.P., SHOKEIR M.O. & DUBEY J.P. (1998). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Applied Environ. Microbiol.*, **64**, 2278–2280.
19. JOHNSON A.M. & ILLANA S. (1991). Cloning of *Toxoplasma gondii* gene fragments encoding diagnostic antigens. *Gene*, **99**, 127–132.
20. KHAN A., BÖHME U., KELLY K.A., ADLEM E., BROOKS K., SIMMONDS M., MUNGALL K., QUAIL M.A., ARROWSMITH C., CHILLINGWORTH T., CHURCHER C., HARRIS D., COLLINS M., FOSKER N., FRASER A., HANCE Z., JAGELS K., MOULE S., MURPHY L., O'NEIL S., RAJANDREAM M.A., SAUNDERS D., SEEGER K., WHITEHEAD S., MAYR T., XUAN X., WATANABE J., SUZUKI Y., WAKAGURI H., SUGANO S., SUGIMOTO C., PAULSEN I., MACKAY A.J., ROOS D.S., HALL N., BERRIMAN M., BARRELL B., SIBLEY L.D. & AJIOKA J.W. (2006). Common inheritance of chromosome 1a associated with clonal expansion of *Toxoplasma gondii*. *Genome Res.*, **16**, 1119–1125.
21. KIJLSTRA A., EISSEN O.A., CORNELISSEN J., MUNNIKSMA K., EIJCK I. & KORTBEEK T. (2004). *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest. Ophthal. Vis. Sci.*, **45**, 3165–3169.
22. LEKUTIS C., FERGUSON D.J., GRIGG M.E., CAMPS M. & BOOTHROYD J.C. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int. J. Parasitol.*, **112**, 1–10.
23. LIN M.H., CHEN T.C., KUO T., TSENG C.C. & TSENG C.P. (2000). Real-Time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 4121–4125.
24. LIND P. & BUXTON D. (2000). Veterinary aspects of *Toxoplasma* infection. In: Congenital Toxoplasmosis; Scientific Background, Clinical Management and Control, Ambroise-Thomas P. & Petersen E., eds. Springer, Paris, France, 261–269.
25. MAHALAKSHIMA B., THERESE K.L., SHYAMALA G., DEVIPRIYA U & MADHAVAN H.N. (2007). *Toxoplasma gondii* detection by nested polymerase chain reaction in lens aspirate and peripheral blood leukocyte in congenital cataract patients: The first report from a tertiary eye hospital in India. *Curr. Eye Res.*, **32**, 653–657.
26. MUNDAY B.L. & CORBOULD A. (1971). The application of the *Toxoplasma* indirect fluorescent-antibody test to sheep sera. *Aust. J. Med. Technol.*, **2**, 3–6.
27. NAGY B., LÁZÁR L., NAGY G., BÁN Z. & PAPP Z. (2007). Detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using quantitative real-time PCR method. *Orv. Hetil.*, **148**, 935–938.
28. RODGER S.M., MALEY S.W., WRIGHT S.E., MACKELLAR A., WESLEY F., SALES J. & BUXTON D. (2006). Ovine toxoplasmosis; the role of endogenous transmission. *Vet. Rec.*, **159**, 768–772.
29. SABIN A.B. & FELDMAN H.A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science*, **108**, 660–663.

30. SAGER H., GLOOR M., TENTER A., MALEY S., HÄSSIG M. & GOTTSTEIN B. (2003). Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA. *Parasitol. Res.*, **91**, 171–174.
31. SAVVA D., MORRIS J.C., JOHNSON J.D. & HOLLIMAN R.E. (1990). Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Med. Microbiol.*, **32**, 25–31.
32. SØRENSEN K.K., MØRK T., SIGURDSDÓTTIR Ó.G., ÅSBAKK K., ÅKERSTEDT J., BERGSJØ B. & FUGLEI E. (2005). Acute toxoplasmosis in three wild arctic foxes (*Alopex alopex*) from Svalbard; one with co-infections of *Salmonella enteritidis* PT1 and *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 2b. *Res. Vet. Sci.*, **78**, 161–167.
33. TENTER A.M., VIETMEYER C. & JOHNSON A.M. (1992). Development of ELISAs based on recombinant antigens for the detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in sheep and cats. *Vet. Parasitol.*, **43**, 189–201.
34. UGGLA A., SJOLAND L. & DUBEY J.P. (1987). Immunohistochemical demonstration of toxoplasmosis in fetuses and fetal membranes of sheep. *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 348–351.
35. VOLLER A., BIDWELL D.E., BARTLETT A., FLECK D.G., PERKINS M. & OLADEHIN B. (1976). A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. *J. Clin. Pathol.*, **29**, 150–153.
36. WASTLING J.M., NICOLL S. & BUXTON D. (1993). Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *J. Med. Microbiol.*, **38**, 360–365.
37. WERRE S.R., JACOBSON R.H., BOWMAN D.D., DUBEY J.P. & MOHAMMED H.O. (2002). Evaluation of kinetics and single-read enzyme-linked immunoassays for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **14**, 225–230.
38. WILLIAMS R.H., MORLEY E.K., HUGHES J.M., DUNCANSON P., TERRY R.S., SMITH J.E. & HIDE G. (2005). High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. *Parasitol.*, **130**, 301–307.

*

* *

ESCHERICHIA COLI VÉROCYTOTOXINOGENE

RÉSUMÉ

Les *Escherichia coli* sont des hôtes normaux du tractus gastro-intestinal de l'animal et de l'homme. Certaines souches ont acquis le pouvoir très particulier de causer des diarrhées et de nombreuses affections extra-intestinales. Depuis 1977, certaines souches de *E. coli* responsables de diarrhées ont été reconnues capables de produire des toxines qui ont un effet cytopathogène irréversible sur des cultures de cellules Vero. Ces *E. coli* dits vérocytotoxinogènes (VTEC pour Verocytotoxigenic *E. coli*) appartiennent à plus de 100 sérotypes différents. *Escherichia coli* O157:H7, qui est le sérotype le plus important et le plus virulent, appartient à un sous-groupe pathogène de VTEC appelés *E. coli* entérohémorragiques (EHEC pour Enterohaemorrhagic *E. coli*). Cette appellation tient au pouvoir qu'ont ces EHEC de provoquer des colites hémorragiques ainsi qu'un syndrome d'urémie hémolytique chez l'homme, de produire des vérocytotoxines, de créer des lésions d'attachement-effacement sur les cellules épithéliales et enfin de posséder un plasmide de grande taille très caractéristique. Au cours des vingt ans passés, le VTEC O157:H7 est devenu un problème de santé publique d'importance croissante au niveau mondial. D'autres sérogroupes non-O157, notamment les sérogroupes O26, O91, O103, O104, O111, O113, O117, O118, O121, O128 et O145, ont été associés à des foyers occasionnels de maladie chez l'homme, les autres sérogroupes étant associés à des cas sporadiques. Les ruminants constituent le principal hôte des VTEC et sont, en général, des porteurs sains de ces microorganismes. Des VTEC ont aussi été isolés de porcs, de chats, de chiens, de poules et d'oiseaux sauvages. Les bovins sont considérés comme le principal réservoir des infections humaines par *E. coli* O157:H7. Malgré son pouvoir pathogène pour l'homme, *E. coli* O157:H7 n'entraîne jamais de signes cliniques chez les animaux. En revanche, les EHEC appartenant aux sérogroupes, O26, O111 et O103 peuvent être pathogènes aussi bien pour l'homme que pour les animaux. C'est la présence de VTEC dans les fèces des animaux qui permet à ces agents pathogènes de gagner la chaîne alimentaire par contamination fécale des produits laitiers, par contamination de la viande à partir du contenu intestinal lors de l'éviscération en abattoir ou par contamination des fruits et légumes venus au contact du fumier. Les VTEC sont également transmis par l'eau de boisson contaminée et par contact direct avec des êtres humains ou des animaux infectés.

Identification de l'agent pathogène : des méthodes de diagnostic ont été mises au point pour les VTEC, surtout pour *E. coli* O157:H7, visant à surmonter les problèmes que posent l'isolement d'un petit nombre des germes en cause qui se trouvent dans des produits organiques complexes tels que les fèces des animaux ou les prélèvements effectués à partir d'aliments ou d'animaux malades. L'identification de *E. coli* O157:H7 chez des animaux porteurs sub-cliniques dépend de l'enrichissement préalable des échantillons de fèces dans un milieu liquide généralement constitué d'eau peptonée tamponnée, additionnée ou non de vancomycine, cefsulodine et cefixime ; le prélèvement est incubé 6 h à 37 °C dans ce milieu, puis traité par un procédé de séparation immunomagnétique employant des particules paramagnétiques ou des billes recouvertes d'anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide de *E. coli* O157. Les billes sur lesquelles se sont fixées les bactéries sont ensuite ensemencées sur une gélose sélective, généralement une gélose MacConkey à 1 % de sorbitol additionnée de cefixime et de tellurite de potassium, qui est incubée 18 h à 37 °C. L'identification de *E. coli* à partir des colonies ne fermentant pas le sorbitol est confirmée par des épreuves biochimiques ou par une agglutination par le sérum ou le latex, démontrant la présence de l'antigène somatique et/ou de l'antigène flagellaire de *E. coli* O157. Le pouvoir pathogène possible de ces bactéries pour l'homme est confirmé par la mise en évidence de la production d'une vérocytotoxine sur cellules Vero, à l'aide de la technique immuno-enzymatique (ELISA) ou des épreuves d'agglutination ou la démonstration, par une réaction en chaîne

d'amplification par polymérase (PCR), de l'existence de gènes codant la vérocytotoxine. La détection des VTEC non-O157 repose sur une analyse directe de colonies qui se sont développées sur des géloses non sélectives en réalisant par exemple, un immunoblot ou en employant une sonde ADN capables de détecter la production de vérocytotoxine. De nombreuses épreuves immunologiques ou de reconnaissance des acides nucléiques ont été décrites, qui visent à permettre un diagnostic d'orientation plus rapide des VTEC, et plusieurs sont commercialisées. Le typage par les bactériophages et l'électrophorèse en champ pulsé sont très utilisés par les Laboratoires de référence pour déterminer les sous-types de VTEC O157 en vue d'études épidémiologiques.

Épreuves sérologiques : les épreuves sérologiques ne sont pas utilisées en routine pour diagnostiquer les infections par VTEC des animaux, mais il a été démontré que les bovins infectés élaboraient des anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide de *E. coli* O157 et que ces anticorps pouvaient être détectés par ELISA.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : il n'existe pas actuellement de vaccins permettant de prévenir l'infection par les VTEC chez l'homme ou l'animal, mais différents vaccins sont en cours de développement à titre expérimental.

A. INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* sont des hôtes normaux de l'appareil digestif des animaux et des êtres humains. Seules certaines de leurs souches se sont étroitement adaptées au point d'entraîner des diarrhées et diverses affections extra-intestinales. Les *Escherichia coli* sont caractérisés, en routine, par l'identification sérologique de leurs antigènes somatiques O, flagellaires H et capsulaires K. Toutefois, tandis que certains sérotypes sont régulièrement associés à des affections cliniques, dans les autres cas la distinction entre souches pathogènes et souches normalement présentes dans la flore intestinale nécessite une identification des facteurs de virulence. Depuis 1977, certaines souches « diarrhéogènes » de *E. coli* se sont avérées capables de produire des toxines ayant un effet cytopathogène irréversible sur des cultures de cellules Vero (19). Ces *E. coli* vérocytotoxinogènes (VTEC pour Verocytotoxigenic *E. coli*) appartiennent à plus de 100 sérotypes différents (16, 33). Ils sont aussi décrits comme des *E. coli* producteurs de Shiga toxine (Shiga toxin-producing *E. coli* : STEC) du fait de la similarité qui a été démontrée entre les vérocytotoxines (VT) et les Shiga toxines (Stx) de *Shigella dysenteriae* (28). Au cours des vingt dernières années, les VTEC O157:H7 ont pris une importance croissante au niveau mondial du fait de leur impact sur la santé publique. *Escherichia coli* O157:H7 est le principal et le plus virulent des sérotypes d'un sous-groupe pathogène de VTEC, appelés *E. coli* entérohémorragiques (enterohaemorrhagic *E. coli* : EHEC). Cette appellation tient au pouvoir qu'ils ont de provoquer des colites hémorragiques et un syndrome d'urémie hémolytique chez l'homme, à leur capacité à produire des VT, à leur capacité de créer des lésions d'attachement-effacement sur les cellules épithéliales et enfin à la possession d'un plasmide de grande taille très caractéristique (27). D'autres sérogroupes non-O157, notamment les sérogroupes O26:H11, O104:H21, O111:H– et O145:H–, ont été associés à des foyers occasionnels de maladie chez l'homme, les autres sérogroupes étant associés à des cas sporadiques (16).

Les ruminants constituent le principal hôte naturel des VTEC et sont, en général, porteurs sains. Des VTEC ont aussi été isolés des porcins, des chats, des chiens, des poules et d'oiseaux sauvages : ces espèces peuvent être colonisées de façon transitoire par les microorganismes (4, 16). Des enquêtes ont démontré que normalement les souches O157 ne constituaient qu'une minorité des VTEC qui colonisent l'intestin des animaux. C'est la présence de ces VTEC dans les fèces animales qui leur permet de s'introduire dans la chaîne alimentaire par contamination fécale du lait, contamination de la viande par le contenu du tube digestif des animaux à l'abattoir, ou contamination des fruits et légumes par du fumier contaminé. Les VTEC sont également transmis par l'eau de boisson ou par contact direct avec des personnes, des animaux ou des déchets d'origine animale. L'eau contaminée utilisée pour l'irrigation ou le lavage des légumes peut aussi être une source d'infection pour l'homme ou les animaux. Les bovins sont considérés comme le principal réservoir d'infection de l'homme par *E. coli* O157:H7, quoique que cette bactérie ait été également isolée de nombreux autres animaux de rente, de chevaux, de chiens, de lapins, d'oiseaux et de mouches. Bien que *E. coli* O157:H7 puisse provoquer une sévère maladie chez l'homme (29), l'infection qu'il entraîne chez l'animal est toujours infraclinique. Certains sérotypes non-O157, cependant, sont pathogènes pour les animaux et l'homme, notamment les sérotypes O26:H11 ; O103:H2 et O111:H– (3, 16).

Des VTEC sont également associés à la maladie œdémateuse du porcelet. Les 4 sérotypes responsables de la majorité des foyers de cette maladie dans le monde sont O45:K+, O138:K81, O139:K82 et O141:K–. Les principaux facteurs de virulence sont une adhésine fimbriale, dite F18, impliquée dans la colonisation de l'organisme, et la toxine VT2, qui est responsable des signes cliniques. L'existence d'une étroite parenté antigénique a été démontrée entre les souches O101 possédant les gènes stx2e d'origine humaine et porcine. Le

rôle des porcs, porteurs sub-cliniques de STEC, dans l'épidémiologie de la maladie humaine devrait donc faire l'objet de recherches complémentaires.

E. coli O157:H7 étant devenu le VTEC le plus important sur le plan zoonotique, des méthodes de diagnostic ont été développées pour détecter ce sérotype de manière sélective en cas de maladie humaine (33) ou dans les aliments (34). Pour ces derniers, une méthode de détection internationale normalisée et validée est disponible (EN ISO 16654:2001). Dans ce chapitre, toutefois, l'accent sera mis sur l'isolement et l'identification du sérotype O157 et d'autres VTEC présents chez les animaux qui en sont porteurs sains (11).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

• Prélèvements

Le plus souvent, les prélèvements à effectuer sur l'animal pour isoler les VTEC seront les fèces récoltées dans le cadre d'une surveillance sanitaire ou dans celui d'une enquête épidémiologique recherchant la trace de l'agent pathogène responsable de cas humains. Les échantillons à tester peuvent être soit des prélèvements réalisés au niveau du rectum, soit des matières fécales fraîchement émises sur le terrain ou récoltées dans l'intestin d'animaux à l'abattoir. Il existe une grande variété de VTEC chez les animaux en bonne santé, et tous ne sont sans doute pas pathogènes pour l'homme. *Escherichia coli* O157:H7, qui est le plus important des VTEC en médecine humaine est hébergé sans signes cliniques notoires par l'animal. Les bovins sont probablement les réservoirs les plus importants de ce sérotype. Dans un troupeau infecté, l'infection ne pourra être détectée que chez certains animaux, les bactéries étant généralement peu nombreuses chez les sujets porteurs et n'étant présentes que de façon intermittente dans leurs fèces. L'excrétion de *Escherichia coli* O157:H7 dépend de l'âge des animaux, de leur alimentation, du stress qu'ils subissent, de la densité de leur population, de la région où ils se trouvent et de la saison (25). Certains animaux contribuent vraisemblablement de façon disproportionnée à la transmission de l'infection et sont, de ce fait, appelés « super-excréteurs » (24). Le taux de réussite des isolements bactériens peut être amélioré en préférant le prélèvement de fèces au raclage de la muqueuse rectale, en augmentant le nombre de prélèvements ainsi que le nombre des animaux objets de ces prélèvements et en répétant les prélèvements. L'utilisation d'écouvillonnages de la muqueuse recto-anale est réputée améliorer la détection des animaux colonisés par rapport aux animaux infectés de manière transitoire. Des précautions devront être prises pour éviter une contamination croisée des échantillons lors de leur acheminement, puis au laboratoire. Ils devront être conservés sous froid et mis en culture le plus rapidement possible après leur récolte.

• Sécurité

Les échantillons, pouvant contenir des VTEC, devront être manipulés avec précautions, sachant que la quantité de bactéries capable d'entraîner de graves infections chez l'homme peut être très faible (de l'ordre de 100 VTEC O157:H7) et que des infections sont déjà survenues au laboratoire (voir Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries »).

• Isolement

a) Milieux d'enrichissement liquides

En routine, les prélèvements sont ensemencés directement sur milieux solides pour isoler *E. coli*, mais les VTEC recherchés dans les fèces de porteurs sains étant généralement peu nombreux, leur isolement sera facilité par culture dans des milieux d'enrichissement liquides. Les milieux de culture d'enrichissement liquides sont généralement constitués d'eau peptonée tamponnée sans complément (bonne croissance mais pas spécifique) ou additionnée de 8 mg/litre de vancomycine, de 10 mg/litre de céfsulodine et de 0,05 mg/litre de céfixime (BPW-VCC), afin d'inhiber la croissance des bactéries prenant la coloration de Gram, ainsi que celle d'*Aeromonas* spp. et de *Proteus* spp. ; de bouillon modifié « trypticase-soy : mTSB » additionné de 20 mg/litre de novobiocine ou de 10 mg/litre d'acriflavine afin de réduire la croissance des bactéries prenant la coloration de Gram ; ou enfin de bouillon modifié pour *E. coli* additionné de 20 mg/litre de novobiocine (mEC+n). Les EHEC *E. coli* poussent mal à 44 °C. Pour réduire au minimum la croissance exagérée des autres germes, l'incubation optimale des fèces de bovins est de 6 h à 37 °C. Pour les prélèvements de viande, c'est un enrichissement durant 6 h entre 41 et 42 °C qui est retenu, et pour les eaux et les produits laitiers, 24 h entre 41 et 42 °C. Un pré-enrichissement non sélectif est nécessaire pour revivifier les *E. coli* O157 lorsqu'ils ont subi un stress et se retrouvent en petit nombre. Les bouillons d'enrichissement doivent être préchauffés afin d'éviter un choc *a frigore* aux bactéries et un ralentissement de leur croissance initiale ; une incubation de 24 h peut améliorer le taux de recouvrement des bactéries qui auraient subi un stress.

b) Séparation immunomagnétique

La séparation immunomagnétique (IMS pour *Immunomagnetic Separation*) a été employée en tant que technique de concentration sélective pour faciliter l'isolement des *E. coli* O157:H7, lorsqu'ils sont en nombre réduit (10). Des particules électromagnétiques disponibles dans le commerce, ou des billes recouvertes d'anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide (LPS) de la bactérie, sont mélangés avec une partie aliquote du bouillon de culture. Les billes sur lesquelles se sont fixées les bactéries sont séparées du surnageant sous l'action d'un champ magnétique et, après lavage, sont ensemencées sur une gélose sélective qui est incubée 18 h à 37 °C pour isoler les colonies suspectes. La technique est spécifique de sérotype. Il existe dans le commerce des systèmes permettant une séparation manuelle ou automatique (9). Le taux de récupération dépend de la proportion de bactéries fixées aux billes, le ratio optimum étant de 3/1 ; il dépend également de la nature du bouillon d'enrichissement utilisé et du problème de l'adsorption non spécifique de *E. coli* aux billes magnétiques, cette adsorption non spécifique pouvant être réduite par l'emploi d'une solution de faible force ionique dans le procédé IMS et par un lavage soigneux des billes. Ces facteurs doivent être pris en compte lorsqu'on vise à maximiser la sensibilité de la technique de détection des *E. coli* que l'on recherche en particulier.

c) Culture sélective des *Escherichia coli* O157

Aucune caractéristique biochimique ne distingue la majorité des VTEC des autres *E. coli*, bien que l'incapacité dans laquelle se trouvent la plupart des souches de *E. coli* O157:H7 de fermenter rapidement le D-sorbitol et le fait qu'elles soient dépourvues de bêta-glucuronidase puissent être exploités pour les isoler et les identifier. Néanmoins, les isolats relativement rares de *E. coli* O157:H- qui fermentent le sorbitol et possèdent une bêta-glucuronidase (dépourvus de mobilité du fait de la non expression de l'antigène H7), ne pourront être identifiés s'ils sont isolés sur des milieux choisis pour sélectionner des bactéries ne possédant pas ces deux caractéristiques (18). La gélose MacConkey, qui contient 1 % de D-sorbitol au lieu de lactose (SMAC) est un milieu pratique et bon marché sur lequel les *E. coli* ne fermentant pas le sorbitol se développent sous forme de petites colonies blanc-grisâtres. La sélectivité de ce milieu est encore améliorée par l'addition de 0,5 % de rhamnose, et de 0,05 mg/litre de céfixime (CR-SMAC), ce qui réduit la croissance de *Proteus* spp. Mais l'addition de rhamnose reste une opération onéreuse, alors que peu de colonies suspectes requièrent l'utilisation de ce milieu. Une modification alternative consiste à ajouter 2,5 mg/litre de tellurite de potassium au céfixime (CT-SMAC), le résultat étant un effet inhibiteur plus marqué sur les *E. coli* non-O157 et sur les autres bactéries qui ne fermentent pas le sorbitol, tels que les genres *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Morganella* et *Providencia*, que sur *E. coli* O157 (28). C'est actuellement le milieu le plus utilisé pour isoler *E. coli* O157.

Des milieux contenant des glucuronides fluorogéniques ou chromogéniques sont utilisés pour distinguer les *E. coli* O157:H7 ne produisant pas de bêta-glucuronidase des *E. coli* qui en produisent. L'hydrolyse du 4-méthylumbelliferyl-bêta-D-glucuronide (MUG) par la bêta-glucuronidase entraîne la formation d'un composé fluorescent visible en lumière ultra-violet. L'addition de 0,1 g/litre de 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-bêta-D-glucuronide (BCIG) au SMAC permet de différencier les colonies blanches de *E. coli* O157:H7 des colonies bleu-vertes des bactéries ne fermentant pas le sorbitol mais possédant une bêta-glucuronidase. Les milieux contenant des glucuronides fluorogéniques ou chromogéniques commercialisés figurent dans les catalogues spécialisés. Bien que des progrès aient été faits dans l'amélioration de la sélectivité des milieux vis-à-vis de *E. coli* O157:H7, le taux de succès de son isolement, notamment lorsque l'on a des germes stressés, peut être affecté du fait de l'emploi de ces additifs. Pour pallier ces effets, l'addition à la gélose tryptone-soy d'agents protecteurs tels que le pyruvate de sodium à 1 %, ou le fait de retarder l'exposition des germes stressés aux produits sélectifs, peut faciliter la récupération de la bactérie (8).

Des *E. coli* O157:H- fermentant le sorbitol ont été isolés de patients présentant de la diarrhée et un syndrome hémolytique et urémique, mais l'épidémiologie de l'infection n'est pas clairement élucidée et cet organisme n'a été isolé que très rarement d'animaux, y compris les bovins (22). La plupart des isolats de *E. coli* O157:H fermentant le sorbitol sont sensibles au tellurite et ne peuvent pas être identifiés sur CT-SMAC. Les analyses microbiologiques de cet organisme sont fastidieuses et impose la mise en culture sur SMAC des bactéries séparées par IMS et le testage de chaque colonie par agglutination au latex pour la recherche de l'antigène O157. Une autre méthode consiste à tester en PCR des colonies prélevées sur gélose pour vérifier la présence des gènes *vt₂*, *eae*, *rfb_{O157}* et *sfpA* (voir ci-dessous). Les colonies bien espacées sur gélose et positives en PCR sont ensuite testées pour hybridation avec les sondes des gènes *vt₂*, *eae* et *sfpA* ou par immunoblot en utilisant des anticorps spécifiques (18, 22).

d) Isolement des autres VTEC

Les VTEC non-O157 poussent bien sur des milieux permettant la croissance de *E. coli*, tels que la gélose au sang ou la gélose MacConkey, et la majorité d'entre eux ne peuvent se distinguer des autres *E. coli* que par leur pouvoir de production de VT. Le nombre élevé de sérotypes différents de VTEC interdit l'emploi d'antisérums O pour un tri de routine et une identification des colonies suspectes sur ces milieux. L'IMS peut être utilisée en vue d'une concentration sélective des sérogroupes O26, O103, O111 et O145 à partir d'un

échantillon pré-enrichi, comme pour les souches O157. Ces sérogroupes sont les VTECs non-O157 les plus souvent associés à des cas humains, et des billes sont disponibles dans le commerce.

Les souches O26 étant incapables de fermenter le rhamnose, des milieux ont été récemment développés qui peuvent s'avérer utiles pour distinguer les *E. coli* O26 du reste de la flore intestinale. Le premier de ces milieux est la gélose MacConkey rhamnosée (rhamnose-MacConkey agar : RMAC) dans laquelle le lactose est remplacé par 10 g/litre de rhamnose. L'addition de 2,5 mg/litre de tellurite de potassium et de 0,05 mg/litre de céfixime (CT-RMAC) améliorerait la sélectivité de ce milieu. Le second milieu est une gélose rhamnosée chromogénique incorporant 10 g/litre de rhamnose et 0,02 g/litre de rouge phénol à une gélose ES pour coliformes (un milieu indicateur de la présence de bêta-galactosidase), à laquelle sont ajoutés 0,5 mg/litre de tellurite de potassium et 0,05 mg/litre de céfixime. Sur ce milieu, les colonies O26 apparaissent bleues sombre à noires, les autres sérotypes de *E. coli* sont verts et les entérobactéries autres qu'*E. coli* sont vertes, jaunes ou incolores.

Un utile marqueur de virulence des VTEC est la production d'entérohémolysine, qui provoque l'hémolyse des hématies de mouton lavées après incubation durant une nuit sur gélose au sang additionnée de calcium. Cette production caractéristique d'hémolysine est aussi le fait de 90 % des *E. coli* producteurs de VT isolés lors d'infections humaines. Toutefois, on s'est aperçu qu'un certain nombre de VTEC pathogènes pouvaient ne pas produire d'entérohémolysine, ce qui réduit l'intérêt d'utiliser la gélose précédemment décrite pour trier les souches de VTEC.

Dans la plupart des cas, l'isolement des VTEC est réalisé en repérant directement sur la gélose les colonies productrices de VT par immunoblot ou par séquençage de l'ADN, afin de mieux les caractériser ensuite. Ces colonies sont d'abord repiquées, de façon à pouvoir disposer d'un double après avoir analysé la colonie originale. À partir de ces colonies, soit un immunoblot est réalisé sur des membranes appropriées (en nitrocellulose ou en nylon) permettant leur répliquation, soit les colonies sont prélevées et déposées dans des plaques de microtitrage à 96 trous contenant du bouillon de culture pour répliquer les colonies avant d'en transférer des aliquots sur des filtres appropriés. Les colonies sont alors analysées à l'aide de sondes nucléiques ou d'anticorps, de façon à identifier tous les VTEC (33). Hull *et al.* (14) ont mis au point une épreuve par immunoblot à la mytomycine qui permet de mettre en évidence les VTEC dans les fèces suffisamment facilement pour qu'elle soit utilisable en routine. Des dilutions en série des fèces effectuées en bouillon sont ensemencées sur des boîtes de gélose MacConkey, et incubées toute la nuit à 37 °C. En utilisant une méthode classique de duplication des colonies, la récolte d'une gélose (représentant environ 200 colonies) est transférée sur deux filtres de cellulose de 0,45 µm de porosité, eux-mêmes déposés sur des gélases Syncase additionnées de 25 ng de mitomycine/ml. Ce milieu induit une croissance végétative de bactériophages porteurs du gène de la VT et facilite l'expression de la toxine. (Il est aussi possible de déposer directement les suspensions de bactéries ou de matières fécales sur des plaques recouvertes d'un filtre). Les plaques sont incubées une nuit à 37 °C. Le lendemain, les filtres sont détachés des plaques, plongés 15 min dans un bain de chloroforme, puis 1 h dans du lait écrémé à 5 % en tampon Tris 10 mM, NaCl 150 mM et Tween 0,05 % (pH 8) (TNT). Les filtres sont incubés 1 h en présence d'antisérums dirigés contre VT1 ou VT2, lavés 3 fois 5 min en TNT, puis incubés 1 h en présence d'un sérum anti-immunoglobuline G conjugué à de la phosphatase alcaline, et lavés de nouveau 3 fois 5 min en TNT. La réaction éventuelle est mise en évidence par coloration au nitrobleu et au 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate. Des *E. coli* non producteurs de VT1, VT2 ou VT sont inclus comme témoins dans l'épreuve. L'usage d'anticorps monoclonaux évitera l'inconvénient des faux résultats positifs observés avec les anticorps polyclonaux. Les résultats obtenus avec les sondes ADN sont comparables à ceux obtenus par l'épreuve immunoblot à la mytomycine, sur colonies. L'épreuve immunoblot a l'avantage d'être plus simple à réaliser que celle des sondes ADN. Les plaques à la mitomycine se conservent plus longtemps si elles sont placées dans l'obscurité à 4 °C.

L'épreuve immunoblot sur colonies et la méthode des sondes ADN sont très laborieuses, et il vaut donc mieux n'y recourir qu'après avoir repéré les prélèvements dans lesquels la VT ou les gènes de la VT ont été mis en évidence par ELISA ou par PCR.

• Identification et caractérisation des colonies suspectes

L'appartenance à l'espèce *E. coli* des bactéries ayant formé des colonies sur milieux solides et suspectes d'être des VTEC doit être confirmée par l'étude de leurs caractères biochimiques ou génotypiques (c-à-d par PCR *GadA*). Leurs antigènes somatiques « O » et flagellaires « H » sont identifiés sérologiquement. Tous les VTEC isolés des animaux ne sont pathogènes pour les humains. Certains isolats de *E. coli* O157, provenant des porcs, ne sont ni vérocytotoxigénique ni pathogène pour les humains. Le diagnostic doit donc inclure la mise en évidence chez ces isolats des facteurs de virulence connus. Il s'agit des vérocytotoxines VT1 (Stx1) et VT2 (Stx2) et de leurs gènes, ainsi que d'une protéine d'adhésion de la membrane externe, l'intimine, qui est codée par le gène *eae* (21). Pour les enquêtes épidémiologiques, les laboratoires de référence disposent de méthodes de sous-typage des souches de VTEC O157.

a) Tests biochimiques

Les VTEC ont des caractères biochimiques analogues à ceux des autres *E. coli*. Les souches de VTEC O157:H7 en diffèrent en ce qu'elles ne fermentent pas le sorbitol et n'ont pas de bêta-glucuronidase, mais fermentent le raffinose et le dulcitol. Les *Escherichia coli* peuvent être distingués des *E. hermanii* par le fait qu'ils ne se développent pas en présence de cyanure de potassium et ne fermentent pas la cellobiose, à l'inverse de *Escherichia hermanii*. Il y a 98 % des souches de *E. hermanii* qui produisent un pigment jaune caractéristique sur gélose nutritive, ce qui ne s'observe jamais avec les VTEC. L'appartenance à l'espèce *Escherichia coli* peut être confirmée en vérifiant que les bactéries dégradent le tryptophane et possèdent une bêta-galactosidase (voir ci-dessous), ou en utilisant des bandelettes diagnostic disponibles dans le commerce.

b) Épreuves sérologiques

Des kits au latex sont disponibles dans le commerce pour le diagnostic des colibacilles O157, O26, O91, O103, O111, O128, O145 et H7. Ces kits doivent être utilisés selon les instructions de leurs fabricants et des témoins latex ainsi que des germes témoins donnant des résultats d'analyse positifs ou négatifs doivent faire partie du test. Un diagnostic de suspicion peut également être porté par agglutinations sur lame ou en tube avec un sérum anti-LPS O (il existe des antisérums vis-à-vis des antigènes 181 O –). L'antisérum O est connu pour entraîner des réactions croisées vis-à-vis d'autres bactéries, dont *E. hermanii* (fréquent dans les aliments), *Salmonella* O groupe N, *Yersinia enterocolitica* sérotype O9 et *Citrobacter freundii*, ce qui oblige à vérifier que les colonies suspectes de VTEC sont bien des *E. coli*. La présence d'antigène flagellaire peut être recherchée dans les isolats (il existe des sérums anti-56 H), mais il faut alors cultiver la bactérie sur gélose mobilité. Certaines bactéries pathogènes sont immobiles.

c) Épreuve sur cellules Vero : production de vérocytotoxine (16)

L'épreuve sur cellules Vero reste la méthode de référence pour confirmer la production de VT (voir ci-dessous). Les membranes plasmiques des cellules Vero contiennent une grande quantité de globotriaosylcéramide (Gb₃) et de globotétraosylcéramide (Gb₄) qui sont les récepteurs sur lesquels se fixent les VT et permettent de détecter, en général, tous les variants de ces toxines. L'épreuve peut être réalisée sur des suspensions de matières fécales, des filtrats de cultures ou des cultures bactériennes vivantes. Dans le cas d'un mélange de matières fécales, la sensibilité de l'épreuve est améliorée par un traitement à la polymyxine B ou à la mytomycine, qui permet de libérer la toxine liée aux cellules. Bien que sensible, cette épreuve n'est pas pratiquée en routine dans la plupart des laboratoires de diagnostic. Elle demande en effet beaucoup de travail et ses résultats ne peuvent être obtenus que 3 à 4 jours après l'inoculation des cellules. Faute de cultures cellulaires, d'autres méthodes peuvent être utilisées pour détecter la production de VT, notamment l'ELISA ou l'agglutination, et la PCR peut détecter les gènes *vt*. Toutes ces méthodes peuvent être maintenant appliquées à l'aide des kits disponibles dans le commerce.

d) Sous-typage de *Escherichia coli* O157 pour études épidémiologiques

De nombreuses méthodes sont appliquées dans les laboratoires de référence pour faciliter la distinction entre les différentes souches de *E. coli* O157:H7 dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques en cas de contaminations humaines (13, 33). Ces méthodes varient en complexité technique, et il en faut plusieurs pour bien différencier les souches. Ces techniques comprennent le typage par les phages, le biotypage et la sensibilité aux produits antimicrobiens (la résistance des souches étant rare dans la plupart des pays), le profil plasmidique, le polymorphisme de restriction (RFLP pour *Restriction Fragment Length Polymorphism*), le ribotypage, l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE pour *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) ainsi que différentes analyses basées sur la PCR telles que l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphique, la PCR répétitive de l'ADN ou le polymorphisme de restriction amplifié. Ce sont le typage par les phages et la PFGE qui sont les techniques les plus utilisées. En dépit de quelques difficultés dans l'interprétation des profils, la PFGE s'est imposée comme la technique de référence dans les laboratoires de santé publique pour le typage des VTEC O157 du fait de son grand pouvoir discriminant, de sa précision et de sa reproductibilité. Elle est employée par « Pulsenet », un réseau de laboratoires de santé publique qui utilise une méthode normalisée de PFGE permettant la comparaison des empreintes ADN répertoriées dans la base de données des « Centres for Disease Control and Prevention » des États-Unis d'Amérique (www.cdc.gov/ncidod/dbmd/pulsenet/pulsenet.htm). Dans l'Union Européenne, le système de surveillance « Enter-net » utilisé pour la surveillance des *Salmonella* et des VTEC repose en grande partie sur le sous-typage des souches *E. coli* O157:H7 par les phages. L'utilisation du sous-typage des gènes de l'intimine et des VT s'est révélée utile dans les études épidémiologiques et la recherche de la source de contamination (5, 6). Le sous-typage des sérotypes non-O157 a été moins bien étudié, mais peut bénéficier des approches utilisées pour le typage des VTEC O157.

• Techniques de détection des VTEC ne nécessitant pas leur culture

Bien que le diagnostic de certitude des VTEC repose sur l'isolement et la caractérisation d'une culture pure, la culture des VTEC est laborieuse et prend beaucoup de temps. C'est pourquoi de nombreuses épreuves immunologiques ou basées sur l'hybridation des acides nucléiques ont été développées en vue d'une identification rapide, dans les prélèvements, des antigènes O et H ainsi que de la VT ou des gènes associés à sa production. Ces épreuves de détection ayant une sensibilité insuffisante pour détecter le nombre relativement faible de bactéries cibles normalement présentes dans les fèces, leur application devra être précédée par une étape d'enrichissement du prélèvement (de préférence non sélective, de façon à isoler les bactéries endommagées ou stressées) ce qui augmentera le nombre de bactéries.

a) Méthodes immunologiques

Les épreuves immunologiques permettant de reconnaître les antigènes O et H et la VT peuvent être utilisées pour confirmer l'identité du germe une fois isolé des prélèvements effectués sur des malades, des aliments ou dans l'environnement. Les autres méthodes, y compris celles utilisant la technologie des membranes ou des bandelettes diagnostic (« dipstick »), les tests sur microplaques, les immunoblots sur colonie, l'immunofluorescence et l'ELISA sont utilisés pour détecter rapidement la présence de bactéries pathogènes suspectes dans les prélèvements, ce qui réduit ainsi les délais du diagnostic d'orientation. La plupart des épreuves visant à reconnaître les antigènes somatiques ou flagellaires sont conçues pour repérer le LPS O157 et l'antigène flagellaire H7. La recherche de la toxine a l'avantage de détecter tous les VTEC. Les épreuves immuno-enzymatiques pour O157 et VT, les épreuves sérologiques pour O157 lisibles à l'œil nu et les épreuves d'agglutination pour O157, H7 et VT sont réalisables avec des kits du commerce (7, 11, 27, 33). Toutes ces épreuves n'ont pas été validées pour une utilisation sur des fèces. Il existe aussi des réactifs spéciaux dans lesquels les anticorps du LPS O157 sont conjugués à la fluorescéine, la peroxydase ou la phosphatase. Parmi les diverses épreuves immuno-enzymatiques, c'est l'ELISA sandwich qui est le plus couramment utilisé. L'anticorps est lié à une structure porteuse de façon à capturer un antigène spécifique des VTEC ; après ajout d'un substrat approprié, un second anticorps couplé à une enzyme se fixe à cet antigène et le colore. Les kits de diagnostic correspondants ont été validés avec des protocoles de pré-enrichissement et des réactifs capables d'assurer des résultats reproductibles. Certains travaillent avec des échantillons chauffés, pour améliorer leur sécurité, ou automatisent l'analyse pour pouvoir traiter un grand nombre d'échantillons. D'autres kits, comme les « blot ELISAs », ont été mis au point pour repérer les colonies dans lesquelles se trouve de l'antigène O157. Les kits du commerce ont l'avantage d'être facilement utilisés par un laboratoire non spécialisé, et les tests doivent être réalisés en suivant les instructions du fabricant. Les kits validés pour tester des échantillons d'aliments ou de carcasses animales, ou des prélèvements réalisés chez des patients, peuvent manquer de sensibilité lorsqu'on les emploie pour l'analyse des fèces d'animaux. Seules les épreuves immunologiques peuvent donner un résultat indicatif, qui doit être confirmé par l'isolement et la caractérisation des bactéries produisant soit l'antigène O157 soit la toxine. Des kits de diagnostic sont disponibles et les Laboratoires de référence de l'OIE doivent être en mesure d'apporter les informations les plus récentes les concernant.

b) Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques

i) Épreuves d'hybridation des colonies

L'hybridation des colonies est une technique utile pour repérer les VTEC au sein d'une population bactérienne hétérogène et de mieux les caractériser. Il existe des sondes ADN et les sondes d'oligonucléotides de synthèse marquées à la digoxigénine ou à la biotine, et donc utilisables dans des laboratoires non spécialisés. Il existe aussi des épreuves permettant de détecter les gènes VT, le plasmide de 60 MDa de *E. coli* O157 et les gènes *eae*, soit individuellement soit tous ensemble (27, 29, 33). Les épreuves d'hybridation sont moins sensibles lorsqu'il s'agit de détecter les VTEC dans des bouillons de culture ou des matières fécales.

ii) PCR pour les gènes VT et autres marqueurs de virulence.

De nombreuses techniques de PCR ont été publiées, qui permettent de détecter les gènes de VT1 et VT2 et les gènes variants de VT2 (27, 29, 33), et plusieurs des méthodes PCR permettant de typer les toxines ont été comparées récemment (36). Le fait de démontrer l'existence de gènes associés à la production de VT ne préjuge pas de l'expression de ces gènes et donc de la production de la toxine. La PCR peut être utilisée sur des cultures pures ou non, sur gélose ou en bouillon, et sur des extraits d'aliments ou de fèces. Elle peut également être utilisée pour détecter les gènes dans des bactéries non viables. Outre son rôle diagnostique, la PCR peut servir à trier les prélèvements effectués dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques sur les VTEC. L'amplification des gènes-cibles dans les ADN bactériens à partir d'extraits des fèces ne réussit pas aussi bien que lorsqu'elle est réalisée sur des cultures pures, et il faut donc soigneusement préparer les échantillons à tester si l'on veut améliorer la sensibilité de l'analyse. Les fèces contiennent des inhibiteurs non spécifiques de la PCR et il n'existe aucune méthode idéale pour les éliminer. La sensibilité de la PCR est améliorée par un pré-enrichissement non sélectif avant l'épreuve, mais reste inférieure à celle de l'IMS ou de la

recherche d'une cytotoxicité sur cellules Vero. Des kits de diagnostic utilisant la PCR sont disponibles dans le commerce.

Des sondes ADN, des tests de PCR et des micro-puces ont été aussi développées pour détecter d'autres gènes des VTEC reconnus comme virulents chez l'homme, notamment *eae* (codant l'intimine), *ehx* (codant l'entérohémolysine), *fliC* (codant l'antigène H7), O157 *rfb* (codant le LPS O157), *uidA* (gène mutant de la glucuronidase des *E. coli* O157:H7 ne produisant pas de bêta-glucuronidase) et *katP* (un gène porté par le grand plasmide de *E. coli* O157:H7, qui code une nouvelle catalase peroxydase (2, 27, 29, 33). De nombreuses épreuves multiplexes ont été mises au point pour détecter simultanément plusieurs gènes utiles au diagnostic. Ces épreuves sont intéressantes pour des caractérisations à partir de cultures pures. Dans le cas des populations bactériennes existant dans les aliments ou les fèces, elles peuvent rendre service dans l'identification des échantillons à partir desquels un isolement devra être réalisé.

- **Tri des fèces en vue de la recherche de *Escherichia coli* O157:H7**

Escherichia coli O157:H7 est le VTEC le plus redouté en santé publique dans la plupart des pays. Son portage intestinal par des animaux sains, notamment les bovins, constitue une source directe ou indirecte de contagion pour l'homme. Le tri des prélèvements repose donc sur des techniques conçues pour résoudre les problèmes que pose l'isolement de petites populations bactériennes, éventuellement en état de stress et entourées d'une flore qui se trouve en compétition avec elles. Ce tri est suivi de l'identification des colonies suspectes et de la recherche des caractéristiques connues de virulence. Les techniques ne cessent d'évoluer et la description qui suit est celle des méthodes employées en routine par un laboratoire national. Les précautions appropriées devront être prises pour éviter toute contamination humaine (voir Chapitre 1.1.2.).

a) Pré-enrichissement

- i) Transporter les fèces dans des récipients stériles et hermétiquement fermés, maintenus à 4 °C, et ensemercer ces fèces dès que possible, de préférence dans les 2 h qui suivent leur récolte. Si les fèces doivent être conservées pour une longue période, elles seront placées à –70 °C ;
- ii) Mélanger les fèces diluées au 1/10 dans de l'eau peptonée tamponnée et réchauffée placée dans un récipient étiqueté ;
- iii) Incuber à 37 °C ± 2 °C pendant 6 h ;
- iv) Prévoir des cultures témoins positives et négatives.

b) Séparation immunomagnétique

- i) L'emploi du produit Dynabeads® anti-*E. coli* O157, 710.04 (DynaL Biotech, ASA, Oslo, Norvège) est agréé par l'AFNOR (DYN 16/02-0696 and DIN 10167) ; Il est cité dans le « Food and Drug Administration's Bacteriological Analytical Manual » (www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html) des Etats-Unis d'Amérique et dans le « Health Canada Compendium of Analytical Methods » (www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendium/volume_3/e_mflp9001.html). C'est également la méthode officielle retenue par le ministère de la santé du Japon.
- ii) Effectuer une IMS selon les instructions du fabricant, à partir des échantillons pré-enrichis, avec la méthode manuelle (MIMS) ou automatisée (AIMS). On prendra soin de bien mélanger les billes avant usage et d'éviter toute contamination croisée entre les tubes déjà préparés. Si l'on utilise la méthode manuelle, il est essentiel de bien respecter les instructions concernant le lavage soigneux des complexes billes-bactéries.
- iii) Après le dernier lavage, utiliser une micropipette pour transférer 50 µl de chaque complexe billes-bactéries sur une gélose MacConkey au sorbitol contenant de la céfixime et du tellurite de potassium (CT-SMAC) (35), en prenant soin d'éviter les contaminations croisées.
- iv) Avec un écouvillon stérile, étaler la goutte de 50 µl sur le tiers ou la moitié de la gélose de façon à briser les complexes. A l'aide d'une anse de platine stérile de 10 µl, étaler à nouveau les complexes billes-bactéries sur un quadrant de gélose, en traçant en surface des lignes partant à angle droit de l'étalement initial. Avec une seconde anse de platine stérile, tracer des lignes partant à angle droit du quadrant précédent et dirigées vers le dernier quadrant encore vierge de la gélose, de façon à obtenir des colonies isolées. Incuber à 37 °C ± 2 °C durant 16 à 18 h (après ce délai les colonies fermentant le sorbitol vont se décolorer, et pourraient être confondues avec des *E. coli* O157 ne fermentant pas le sorbitol). Une autre méthode pour isoler les colonies ne fermentant pas le sorbitol consiste à étaler tout l'inoculum à la surface d'une gélose CT-SMAC sèche avec une pipette boutonnée stérile.

c) Identification des colonies

- i) Prélever 10 colonies blanches « sorbitol-négatives » par gélose et les soumettre à l'épreuve de l'agglutination au latex O157 en suivant les instructions du fabricant (inclure les témoins appropriés : bactéries donnant une réaction positive ou négative et latex).
- ii) Repiquer les colonies agglutinables sur un milieu solide sans antibiotiques (par exemple une gélose au sang de mouton). Les étaler de façon à isoler de nouvelles colonies. Incuber une nuit à 37 °C ± 2 °C.

d) Confirmation de l'espèce *Escherichia coli*

- i) Inoculer un bouillon o-nitrophényl bêta-D-galactopyranoside. Placer des témoins positifs et négatifs. Incuber une nuit, en aérobiose à 37 °C. Les *Escherichia coli* donnent un résultat positif, reconnaissable à l'apparition d'une coloration jaune qui confirme l'activité de leur bêta-galactosidase.
- ii) À l'aide d'une pince stérile, déposer une rondelle de papier filtre en membrane de nitrate de cellulose de 0,45 µm sur une boîte de gélose biliée tryptonée (TBA). En utilisant une anse de platine stérile de 1 µl, prélever une anse du produit à analyser qui servira à inoculer une surface de la taille d'un petit pois sur un filtre Millipore. Placer des témoins positifs et négatifs. Incuber au moins 17 h à 44 °C. Transférer la membrane sur un papier filtre imprégné de réactif à l'indole permettant de détecter la dégradation du tryptophane. Les *Escherichia coli* présentent une réaction positive, reconnaissable à une coloration rose pourpre.
- iii) Il existe dans le commerce un réactif permettant la détection de l'indole. Ce réactif est déposé sur un papier filtre et on écrase sur la tache de réactif un morceau de la colonie suspecte. La réaction ne demande pas plus de 5 min et le résultat peut être confirmé par l'épreuve précédemment décrite si aucune réaction n'apparaît. Du milieu pour l'indole est aussi disponible dans le commerce.
- iv) On peut aussi employer des kits du commerce pour confirmer l'identification de l'espèce *E. coli*.

e) Détermination somatique (24)

- i) À l'aide d'une anse de platine stérile, prélever une colonie isolée obtenue grâce à la méthode d'identification décrite ci-dessus au point c) et la repiquer dans 4 ml de bouillon Schlecht (31). Incuber une nuit à 37 °C ± 2 °C.
- ii) Porter le bouillon Schlecht à ébullition pendant au moins 1 h à 100 °C.
- iii) Répartir 25 µl d'une solution saline à 0,85 % dans les puits n°2 à 12 d'une plaque de microtitrage à fond en U. Déposer 50 µl de sérum anti O157 dans le puits n°1. Réaliser des dilutions de 2 en 2 de l'antisérum O157 jusqu'à la dilution 1/1 024, en écartant 25 µl après l'avoir bien mélangé. Ajouter 50 µl du bouillon qui avait été porté à ébullition dans les puits n°1 à 12. Remplacer leur couvercle sur les plaques pour prévenir toute évaporation et incuber 6 h à 37 °C. Examiner les plaques sur fond noir pour observer une agglutination éventuelle dans les puits.

f) Épreuve sur cellules Vero

- i) À l'aide d'une anse de platine stérile, prélever une colonie isolée obtenue grâce à la méthode d'identification des colonies décrite ci-dessus au point c) et la repiquer dans 4 ml de bouillon Mundell (26). Incuber une nuit à 37 °C ± 2 °C ;
- ii) Préparer des bouillons contenant des souches témoins ne produisant pas de toxine, de toxine thermolabile, de facteur cytotoxique nécrosant et de VT. Incuber une nuit à 37 °C ± 2 °C ;
- iii) Déposer des cellules Vero (Cellules de rein provenant des singes vert d'Afrique, référence ATCC CCL81), 24 h avant l'ensemencement, dans des plaques de microtitrage à fond plat : 200 µl d'une suspension à 2 × 10⁵ cellules /ml dans chaque puits. Incuber 24 h à 37 °C ± 2 °C dans une étuve à 5 % de CO₂ ;
- iv) Ajouter, dans chaque bouillon de culture de la nuit, 100 µl d'une solution en eau distillée stérile de sulfate de polymyxine B à 400 000 unités/ml. Incuber 5 h à 37 °C ± 2 °C ;
- v) Centrifuger les bouillons à 3 000 tr/min pendant 30 min ;
- vi) Placer les surnageants dans des flacons stériles étiquetés (il faut environ 1,5 ml par flacon) ;
- vii) Placer les plaques de cellules Vero sur une feuille numérotée pour pouvoir identifier chacun des puits. Inoculer 10 µl du surnageant préparé dans le puits correspondant de cellules Vero. Remettre les cellules dans l'étuve à CO₂ et les y laisser 3 jours ;
- viii) Examiner les cellules après 24 h, 48 h, et 72 h, en recherchant tout effet cytopathogène éventuel. Comparer avec les témoins positifs et négatifs. Si des échantillons contiennent des VT, le tapis cellulaire sera détruit et des cellules noircies et rétractées seront visibles en 24 à 72 h.

g) PCR multiplex pour VT1, VT2 et eae (1, 15, 32)

La PCR multiplex est employée pour confirmer la présence éventuelle de marqueurs de virulence en utilisant les amorces de la façon suivante :

Gène cible	Accession n°	Séquence des amorces	Position des nucléotides	Taille de l'amplicon (pb)
VT1	M19437	F (5'-CGC-TCT-GCA-ATA-GGT-ACT-CC-3')	287–306	256
		R (5'-CGC-TGT-TGT-ACC-TGG-AAA-GG-3')	522–541	
VT2	X07865	F (5'-TCC-ATG-ACA-ACG-GAC-AGC-AG-3')	623–642	185
		R (5'-GC-TTC-TGC-TGT-GAC-AGT-GAC-3')	788–807	
eaeA	X60439	F (5'-GC-TTA-GTG-CTG-GTT-TAG-GAT-TG-3')	271–293	618
		R (5'-CCA-GTG-AAC-TAC-CGT-CAA-AG-3')	871–890	

- i) À l'aide d'une anse de platine stérile, prélever une colonie isolée obtenue grâce à la méthode d'identification des colonies décrite ci-dessus au point c et la repiquer dans 1 ml de bouillon Luria-Bertani. Prévoir 3 témoins appropriés. Incuber une nuit à 37 °C ± 2 °C ;
- ii) Porter les bouillons à ébullition 15 min à 100 °C. Les retirer du bain Marie et les laisser refroidir ;
- iii) Préparer la solution dans laquelle seront mélangés 48 µl de chacun des échantillons, contenant :
1× tampon Saiki (50 mM KCl ; 10 mM Tris, pH 8,5 ; 100 µg/ml de gélatine) ; 3 mM de MgCl₂ ; 0,5 U de Taq polymérase ; 25 pmoles de chaque amorce (sens et anti-sens pour VT1, VT2 et eaeA) ; 0,2 mM de chaque base nucléotidique dATP, dCTP, dGTP et dTTP.
- iv) Mélanger en retournant les tubes et distribuer 48 µl du mélange dans chaque tube de réaction PCR ;
- v) Déposer 2 µl de la culture précédemment portée à ébullition (extrait brut d'ADN) au fond de chaque tube réactif (ajouter 3 extraits témoins et témoin milieu) ;
- vi) Lancer la PCR en utilisant les paramètres d'un cycle de dénaturation initiale à 94 °C pendant 2 min ; 25 cycles comprenant un étape de dénaturation à 94 °C pendant 1 min, une étape de dénaturation à 62 °C pendant 1,5 min et une étape d'élongation à 72 °C pendant 2 min ; avec une étape complémentaire finale de 72 °C pendant 5 min. Les échantillons sont conservés à 4 °C jusqu'à ce qu'on en ait besoin pour l'électrophorèse ;
- vii) Soumettre 15 µl de chaque échantillon de PCR à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % en tampon E (10× une solution forte réalisée par addition successive dans de l'eau distillée de : 109 g/litre de Tris, 55,6 g/litre d'acide orthoborique, 9,3 g d'EDTA. Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée ajustée à pH 8 avec 10 ml d'acide chlorhydrique dilué avant usage dans de l'eau distillée). Faire migrer une échelle de poids moléculaire de 100 pb comme référence.
- ix) Colorer au bromure d'éthidium et observer en lumière ultraviolette.
- x) Examiner les lignes témoins pour repérer la position de VT1, VT2 et des amplicons eae. Comparer avec les bandes présentes dans les lignes de l'échantillon. Enregistrer les résultats.

2. Épreuves sérologiques

Chez l'homme, le sérodiagnostic des VTEC peut être intéressant, particulièrement en phase tardive de la maladie lorsque l'agent causal devient de plus en plus difficile à isoler dans les fèces. Le LPS s'est avéré l'antigène de choix, et la production d'anticorps dirigé contre le LPS des très nombreux sérotypes existants de VTEC a été bien démontrée. Les épreuves sérologiques ne sont pas utilisées pour le diagnostic de l'infection animale par les VTEC. Néanmoins, il a été prouvé que l'exposition des bovins à une infection par *E. coli* O157:H7 était suivie de la production d'anticorps dirigés contre le LPS O157, et que ces anticorps persistaient pendant des mois, comme l'ont révélé des ELISA indirects (17). Des réactions croisées ont été constatées entre les LPS-O157 et les LPS d'autres bactéries, dont *E. coli* O55, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Brucella abortus* et des souches de *Vibrio cholerae* non-O1. Afin de réduire le nombre de ces réactions croisées, un ELISA bloquant, produit avec un anticorps monoclonal compétiteur spécifique de *E. coli* O157, a été développé ; il permet de repérer, chez les bovins, les anticorps sériques dirigés contre l'antigène O 157 (20). Des anticorps sériques dirigés contre la VT1, mais pas contre la VT2, ont été observés chez les bovins lors d'épreuves de neutralisation de la toxine sur cellules Vero (17). D'autres études chez les bovins ont montré une plus grande prévalence d'anticorps neutralisant la VT1 que d'anticorps neutralisant la VT2, ce qui peut s'expliquer par une plus grande prévalence des VTEC producteurs de VT1 chez les bovins, et/ou par un moindre pouvoir antigénique des VT2.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Il n'y a pas actuellement de vaccins permettant de prévenir les VTEC transmissibles à l'homme. Diverses approches vers un contrôle immunologique des infections à EHEC chez l'homme sont en cours de développement (23). Elles visent à prévenir la colonisation de l'intestin, les affections intestinales ou les graves séquelles du syndrome d'urémie hémolytique et du purpura thrombotique thrombocytopénique. Elles font appel à des vaccins conjugués (constitués d'un complexe entre le polysaccharide O157 et les sous-unités B de la VT1 et de la VT2 utilisées comme protéines porteuses), à des vaccins à vecteurs vivants, à des anatoxines ou à une immunisation passive par des globulines hyperimmunes ou des anticorps monoclonaux dirigés contre la VT. Toutefois, si un vaccin efficace était découvert, il s'ouvrirait un débat au sujet des conséquences sociales, politiques et économiques d'une vaccination à grande échelle de l'homme contre des agents pathogènes qui se trouvent dans ses aliments. Etant donné que les animaux, notamment les bovins, sont considérés comme des réservoirs de l'infection pour l'homme, une nouvelle stratégie est actuellement envisagée qui consisterait à vacciner ces bovins de façon à réduire la colonisation de leur organisme par les VTEC et à réduire ainsi la contamination des aliments et de l'environnement (ce qui reviendrait à rendre les aliments plus sûrs, plutôt que de protéger les gens contre leurs aliments). Pour ce faire, l'une des approches consisterait à utiliser une souche vivante, atoxinogène et capable de coloniser l'organisme, comme vaccin administrable par voie orale et induisant des anticorps contre les composants de surface de la bactérie ; une autre possibilité envisagée serait d'administrer des facteurs favorisant la colonisation de l'organisme, tels que l'intimine, sous la forme d'un vaccin mangeable produit par des plantes transgéniques (12).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BEEBAKHEE G., LOUIE M., DE AZAVEDO J. & BRUNTON J. (1992). Cloning and nucleotide sequence of the *eae* gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. *FEMS Microbiol. Lett.*, **91**, 63–68.
2. BEKAL S., BROUSSEAU R., MASSON L., PREFONTAINE G., FAIRBROTHER J. & HAREL J. (2003). Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2113–2125.
3. BETTELHEIM K.A. (2000). Role of non-O157 VTEC. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 38S–50S.
4. BEUTIN L., GEIER D., STEINRUCK H., ZIMMERMANN S. & SCHEUTZ F. (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 2483–2488.
5. BEUTIN L., KRAUSE G., ZIMMERMANN S., KAULFUSS S. & GLEIER K. (2004). Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1099–1108.
6. BEUTIN L., MIKO A., KRAUSE G., PRIES K., HABY S., STEEGE K. & ALBRECHT N. (2007). Identification of human-pathogenic strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of shiga toxin genes. *Appl. Env. Microbiol.*, **73**, 4769–4775.
7. BOER E. DE & HEUVELINK A.E. (2001). Evaluation of methods for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from foods and faeces. Proceedings of European Union Concerted Action CT98-3935. Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. 1. Methods for Verocytotoxigenic *E. coli*, Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y. & McDowell D.A., eds. *Int. J. Food Microbiol.*, **66**, 25–35.
8. BLACKBURN C. DE W. & MCCARTHY J.D. (2000). Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **55**, 285–290.
9. CHAPMAN P.A. & CUDJOE K.S. (2001). Evaluation of Bead retriever™, an automated system for concentration of *Escherichia coli* O157 from enrichment cultures by immunomagnetic separation. *J. Rapid Methods Automation Microbiol.*, **9**, 203–214.
10. CHAPMAN P.A., WRIGHT D.J. & SIDONS C.A. (1994). A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J. Med. Microbiol.*, **40**, 424–427.
11. CLIFTON-HADLEY F.A. (2000). Detection and diagnosis of *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxigenic *E. coli* in animal faeces. *Rev. Med. Microbiol.*, **11**, 47–58.

12. GYLES C.L. (1998). Vaccines and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in animals. In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Kaper J.B. & O'Brien A.D. eds. ASM Press, Washington, D.C., USA, 434–444.
13. HOPKINS K.L. & HILTON A.C. (2000). Methods available for the sub-typing of *Escherichia coli* O157. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 741–748.
14. HULL A.E., ACHESON D.W.K., ECHEVERRIA P., DONOHUE-ROLFE A. & KEUSCH G.T. (1993). Mitomycin immunoblot colony assay for detection of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples: comparison with DNA probes. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1167–1172.
15. JACKSON M.P., NEILL R.J., O'BRIEN A.D., HOLMES R.K. & NEWLAND J.W. (1987). Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **44**, 109–114.
16. JOHNSON R.P., CLARKE R.C., WILSON J.B., READ S.C., RAHN K., RENWICK S.A., SANDHU K.A., ALVES D., KARMALI M.A., LIOR H., MCEWEN S.A., SPIKA J.S. & GYLES C.L. (1996). Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Protect.*, **59**, 1112–1122.
17. JOHNSON R.P., CRAY W.C. & JOHNSON S.T. (1996). Serum antibody responses of cattle following experimental infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.*, **64**, 1879–1883.
18. KARCH H. & BIELASZEWSKA M. (2001). Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H–strains: Epidemiology, phenotypic and molecular characteristics and microbiological diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2043–2049.
19. KONOWALCHUK J., SPEIRS J.I. & STAVRIC S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **18**, 775–779.
20. LAEGREID W., HOFFMAN M., KEEN J., ELDER R. & KWANG J. (1998). Development of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to O157 antigen of *Escherichia coli*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **5**, 242–246.
21. LAW D. (2000). Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 729–745.
22. LEE J.H. & CHOI S. (2006). Isolation and characteristics of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 strains from cattle. *Microbes and Infection*, **8**, 2021–2026.
23. LEVINE M.M. (1998). Immunoprophylaxis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection and disease: strengths and weaknesses of various strategies. In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Kaper J.B. & O'Brien A.D., eds. ASM Press, Washington, D.C. USA, 405–408.
24. MATTHEWS L., MCKENDRICK I.J., TERNENT H., GUNN G.J., SYNGE B. & WOOLHOUSE M.E.J. (2006). Super-shedding cattle and the transmission dynamics of *Escherichia coli* O157. *Epidem. Infect.*, **134**, 131–142.
25. MEYER-BROSETA S., BASTIAN S.N., ARNE P.D., CERF O. & SANAA M. (2001). Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **203**, 347–361.
26. MUNDELL D.H., ANSELMO C.R. & WISHNOW R.M. (1976). Factors influencing heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin activity. *Infect. Immun.*, **14**, 383–388.
27. NATARO J.P. & KAPER J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**, 142–201.
28. O'BRIEN A.D. & LAVECK G.D. (1983) Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* type 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **40**, 675–683.
29. PATON J.C. & PATON A.W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**, 450–479.
30. RICE D.H., SHENG H.Q., WYNIA S.A. & HOVDE C.J. (2003). Rectoanal mucosal swab culture is more sensitive than fecal culture and distinguishes *Escherichia coli* O157:H7-colonized cattle and those transiently shedding the same organism. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4924–4929.
31. RING K. & SCHLECHT S. (1970). Ein neuer laboratoriumsfermenter zur züchtung von mikroorganismen im turbidostatischen, chemostatischen und "batch" verfahren. II. Mitteilung. Arbeitsweise und anwendungsbeispiele. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde*, **213**, 103–119.

32. STROCKBINE N.A., JACKSON M.P., SUNG L.M., HOLMES R.K. & O'BRIEN A.D. (1988). Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J. Bacteriol.*, **170**, 1116–1122.
33. STROCKBINE N.A., WELLS J.G., BOPP C.A. & BARRETT T.J. (1998). Overview of detection and subtyping methods. *In: Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Kaper J.B. & O'Brien A.D., eds. ASM Press, Washington, D.C., USA, 331–356.
34. VERNZOY-ROZAND C. (1997). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in food. *J. Appl. Microbiol.*, **82**, 537–551.
35. ZADIK P.M., CHAPMAN P.A. & SIDDONS C.A. (1993). Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.*, **39**, 155–158.
36. ZIEBELL K.A., READ S.C., JOHNSON R.P. & GYLES C.L. (2002). Evaluation of PCR and PCR-RFLP protocols for identifying Shiga toxins. *Res. Microbiol.*, **153**, 289–300.

*

* *

NB : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour *Escherichia coli* vérocytotoxinogène (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)

ZOONOSES TRANSMISSIBLES DEPUIS LES PRIMATES AUTRES QUE L'HOMME

Pour les normes concernant les tests de diagnostic réalisés sur les primates non-humains, veuillez consulter le document suivant :

Health monitoring of non-human primate Colonies. Recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Non-Human Primate Health accepted by the FELASA Board of Management, 21 Novembre 1998.

<http://www.lal.org.uk/pdffiles/LAfeI5.pdf>

*
* *

PARTIE 3

EXPERTS DE RÉFÉRENCE DE L'OIE ET INDEX DES MALADIES

LISTE DES LABORATOIRES DE RÉFÉRENCE DE L'OIE EN 2008¹

Agalaxie contagieuse – Contagious agalactia – Agalaxia contagiosa

Dr Robin A.J. Nicholas

Mycoplasma Group, Department of Statutory and Exotic Bacterial Diseases, VLA Weybridge
New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1932) 34 11 11 – Fax : (44.1932) 34 70 76
Email : r.a.j.nicholas@vla.defra.gsi.gov.uk

Anémie infectieuse des équidés – Equine infectious anaemia – Anemia infecciosa equina

Dr Eileen N. Ostlund

Diagnostic Virology Laboratory, National Veterinary Services Laboratories
P.O. Box 844, Ames, IA 50010
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.515) 663.75.51 – Fax : (1.515) 663.73.48
Email : eileen.n.ostlund@aphis.usda.gov

Dr Kenji Murakami

Viral disease Section, National Institute of Animal Health
3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856
JAPON JAPAN JAPÓN
Tel : (81.29) 838.78.41 – Fax : (81.29) 838.79.07
Email : muraken@affrc.go.jp

Anémie infectieuse du saumon – Infectious salmon anaemia – Anemia infecciosa del salmón

Dr Frederick Kibenge

Atlantic Veterinary College, Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, Charlottetown, Prince Edward Island, C1A 4P3
CANADA CANADA CANADÁ
Tel : (1.902) 566.09.67 – Fax : (1.902) 566.08.51
Email : kibenge@upe.ca

Dr Birgit Dannevig

National Veterinary Institute, Ullevålsveien 68, P.O. Box 8156 Dep., 0033 Oslo
NORVÈGE NORWAY NORUEGA
Tel : (47.23) 21.64.04 – Fax : (47.23) 21.63.01
Email : birgit.dannevig@vetinst.no

1 Pour certaines maladies, deux instituts ont été désignés conjointement comme laboratoire ou centre collaborateur de référence de l'OIE. Dans ce cas les mentions (1) et (2) sont placées après les noms des experts de référence désignés.

For certain diseases, two institutions have been jointly designated as OIE Reference Laboratory or Collaborating Centre. Where this occurs, the superscript (1) or (2) will be placed after the name of the designated Reference Expert.

Para algunas enfermedades, se designaron conjuntamente dos instituciones como Laboratorios de Referencia o Centros Colaboradores. En tales casos los Expertos de Referencia vienen señalados con los respectivos índices notescritas (1) y (2)

Artérite virale équine – Equine viral arteritis – Arteritis viral equina

Dr Peter J. Timoney

Maxwell H. Gluck Equine Research Center, Chair and Director, Dept of Veterinary Science, University of Kentucky, 108 Gluck Equine Research Center, Lexington, Kentucky 40546-0099
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.859) 257.47.57 ext. 81085 – Fax : (1.859) 257.85.42
Email : ptimoney@uky.edu

Dr Takashi Kondo

Epizootic Research Center, Equine Research Institute, The Japan Racing Association,
1400-4, Shiba, Shimotsuke-shi, Tochigi 329-0412
JAPON JAPAN JAPÓN
Tel : (81.285) 44.00.90 – Fax : (81.285) 40.10.64
Email : kondo@epizoo.equinst.go.jp

Dr Trevor W. Drew

Head of Virology Department, VLA Weybridge, Woodham Lane, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1932) 35.76.37 – Fax : (44.1932) 35.72.39
Email : t.w.drew@vla.defra.gsi.gov.uk

Arthrite/encéphalite caprine – Caprine arthritis/encephalitis – Artritis/encefalitis caprina

Dr Stephen Valas

Laboratoire d'étude et de recherches caprines
60 rue du Pied de Fond, B.P. 3081, 79000 Niort
FRANCE FRANCE FRANCIA
Tel : (33) (0)5 49.79.61.28 – Fax : (33) (0)5 49 79 42 19
Email : s.valas@niort.afssa.fr

Dr Don P. Knowles, Jr

Animal Diseases Research Unit, USDA, ARS, Washington State University
Pullman, Washington 99164-7030
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.509) 335.60.22 – Fax : (1.509) 335.83.28
Email : dknowles@vetmed.wsu.edu

Avortement enzootique des brebis (chlamydiose ovine) – Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydiosis) – Aborto enzoótico de las ovejas (clamidiosis ovina)

Dr Konrad Sachse

Friederich-Loeffler Institute, Institute of Bacterial Infections and Zoonoses,
Jena, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena
ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA
Tel : (49.3641) 80.43.34 – Fax : (49.3641) 80.42.28
Email : konrad.sachse@fli.bund.de

Dr Nicole Borel

Institute for Veterinary Pathology (IVPZ), Vetsuisse Faculty, University of Zurich
Winterthurerstrasse 268, CH-8057 Zurich
SUISSE SWITZERLAND SUIZA
Tel : (41.44) 635.85.51 – Fax : (41.44) 635.89.34
Email : apos@vetpath.unizh.ch

Babésiose bovine – Bovine babesiosis – Babesiosis bovina

Prof. Ikuo Igarashi

National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine
Inada-cho Nishi 2-13, Obihiro, Hokkaido 080-8555
JAPON JAPAN JAPÓN
Tel : (81.155) 49.56.42 – Fax : (81.155) 49.56.43
Email : protozoa@obihiro.ac.jp

Baculovirose sphérique (Baculovirus spécifique de *Penaeus monodon*) – Spherical baculovirus (*Penaeus monodon*-type baculovirus) – Baculovirosis esférica (baculovirus de tipo *Penaeus monodon*)

Prof. Donald V. Lightner

Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona
Building 90, Room 202 Pharmacy/Microbiology, Tucson, AZ 85721

ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Tel : (1.520) 621.84.14 – Fax : (1.520) 621.48.99

Email : dvl@u.arizona.edu

Dr Grace Lo

Department and Institute of Zoology, National Taiwan University

1, Sec. Roosevelt Road, Taipei

TAIPEI CHINOIS TAIPEI CHINA TAIPEI CHINO

Tel : (886.2) 23.63.35.62 – Fax : (886.2) 23.63.81.79

Email : gracelow@ccms.ntu.edu.tw

Baculovirose tétraédrique – Tetrahedral baculovirus – Baculovirosis tetraédrica (*Baculovirus penaei*)

Prof. Donald V. Lightner

Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona
Building 90, Room 202 Pharmacy/Microbiology, Tucson, AZ 85721

ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Tel : (1.520) 621.84.14 – Fax : (1.520) 621.48.99

Email : dvl@u.arizona.edu

Brucellose – Brucellosis – Brucelosis (*Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*)

Dr Heinrich Neubauer

Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals (BFAV), Institute of Bacterial Infections and Zoonoses
Naumburger Str. 96a, 07743 Jena

ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA

Tel : (49.3641) 80.42.00 – Fax : (49.3641) 80.42.28

Email : heinrich.neubauer@fli.bund.de

Dr Ana Maria Nicola

Gerencia de Laboratorios (GELAB), Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)

Av. Alexander Fleming 1653, 1640 Martínez, Pcia. de Buenos Aires

ARGENTINE ARGENTINA ARGENTINA

Tel : (54.11) 48.36.19.92 – Fax : (54.11) 48.36.19.92

Email : anicola@senasa.gov.ar

Dr Klaus Nielsen

Canadian Food Inspection Agency, Animal Diseases Research Institute

P.O. Box 11300, Station H, Nepean, Ontario K2H 8P9

CANADA CANADA CANADÁ

Tel : (1.613) 228 66 98 – Fax : (1.613) 228 66 67

Email : nielsenk@inspection.gc.ca

Dr Bruno Garin-Bastuji

AFSSA Alfort, Unité Zoonoses Bactériennes, Lab. OIE/FAO de référence pour la brucellose animale, Laboratoire
d'études et de recherches en pathologie animale et zoonoses

23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex

FRANCE FRANCE FRANCIA

Tel : (33 (0)1) 49 77 13 00 – Fax : (33 (0)1) 49 77 13 44

Email : b.garin-bastuji@afssa.fr

Dr Menachem Banai

Kimron Veterinary Institute

Department of Bacteriology, P.O. Box 12, Beit Dagan 50250

ISRAËL ISRAEL ISRAEL

Tel : (972.3) 968 16 98 – Fax : (972.3) 968 17 53

Email : menachemba@moag.gov.il

Brucellose – Brucellosis – Brucelosis (*Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*)

Dr Massimo Scacchia

CESME, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', National Centre for Exotic Diseases

Via Campo Boario, 64100 Teramo

ITALIE ITALY ITALIA

Tel : (390.861) 33.24.05 – Fax : (390.861) 33.22.51

Email : m.scacchia@izs.it

Dr Judy A. Stack

VLA Weybridge

New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB

ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO

Tel : (44.1932) 34 11 11 – Fax : (44.1932) 34 70 46

Email : j.a.stack@vla.defra.gsi.gov.uk

Bursite infectieuse (Maladie de Gumboro) – Infectious bursal disease (Gumboro disease) – Bursitis infecciosa (Enfermedad de Gumboro)

Dr Yehia M. Saif

Food Animal Health Research Program, Ohio Agricultural Research and Development Center, The Ohio State University

1680 Madison Avenue, Wooster, OH 44691-4096

ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Tel : (1.330) 263.37.43 – Fax : (1.330) 263.36.77

Email : saif.1@osu.edu

Dr Nicolas Eterradossi

AFSSA Ploufragan, Unité de virologie, immunologie et parasitologie aviaires et cunicoles

BP 53, 22440 Ploufragan

FRANCE FRANCE FRANCIA

Tel : (33 (0)2) 96.01.62.22 – Fax : (33 (0)2) 96.01.62.63

Email : n.eterradossi@ploufragan.afssa.fr

Cachexie chronique – Chronic wasting disease – Caquexia crónica

Dr Aru Balachandran

Canadian Food Inspection Agency, Ottawa Laboratory

3851 Fallowfield Road, P.O. Box 11300, Station H, Nepean, Ontario K2H 8P9

CANADA CANADA CANADÁ

Tel : (1.613) 228.66.98 – Fax : (1.613) 228.66.69

Email : balachandrana@inspection.gc.ca

**Campylobactérioses – Campylobacteriosis – Campilobacteriosis
Campylobactériose génitale bovine – Bovine genital campylobacteriosis – Campilobacteriosis genital bovina**

Dr Jaap Wagenaar⁽¹⁾

Animal Sciences Group (ASG), Division of Infectious Diseases

P.O. Box 65, 8200 AB Lelystad

PAYS-BAS THE NETHERLANDS PAÍSES BAJOS

Tel : (31.320) 23.81.57 – Fax : (31.320) 23.89.61

Email : j.a.wagenaar@vet.uu.nl

Dr Jaap Wagenaar⁽²⁾

Faculty of Veterinary Medicine (FVM), Department of Infectious Diseases and Immunology

P.O. Box 80.165, 3508 TD Utrecht

PAYS-BAS THE NETHERLANDS PAÍSES BAJOS

Tel : (31.30) 253.12.42 – Fax : (31.30) 253.31.99

Email : j.a.wagenaar@vet.uu.nl

Chlamydie aviaire – Avian chlamydiosis – Clamidosis aviar

Dr Konrad Sachse

Friederich-Loeffler Institute, Institute of Bacterial Infections and Zoonoses
Jena, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena
ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA
Tel : (49.3641) 80.43.34 – Fax : (49.3641) 80.42.28
Email : konrad.sachse@fli.bund.de

Clavelée et variole caprine – Sheep pox and goat pox – Viruela ovina y viruela caprina

Dr Hamid Reza Varshovi

RAZI Vaccine and Serum Research Institute
P.O. Box 19171/148, Hessarak Karadj, Teheran
IRAN IRAN IRÁN
Tel : (98.21) 311.79.08 – Fax : (98.261) 455.46.58
Email : int@rvsri.com ou hr_varshovi@yahoo.com

Dr Eeva Tuppurainen

Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory
Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1483) 23.24.41 – Fax : (44.1483) 23.24.48
Email : eeva.tuppurainen@bbsrc.ac.uk

Contrôle des médicaments vétérinaires en Afrique subsaharienne – Control of Veterinary Medicinal Products in Sub-Saharan Africa – Control de los Medicamentos Veterinarios en África subsahariana

Dr Assiongbon Teko-Agbo

Ecole Inter-Etats de Science et Médecine Vétérinaire (EISMV)
BP 5077, Dakar
SÉNÉGAL SENEGAL SENEGAL
Tel : (221) 865.10.08 – Fax : (221) 825.42.83
Email : tekoagbo2001@yahoo.fr

Cowdriose – Heartwater – Cowdriosis

Dr Dominique Martinez

CIRAD-EMVT
Head of Research Unit, Control of exotic and emerging animal diseases, TA30/G Campus international de Baillarguet,
34398 Montpellier Cedex 5
FRANCE FRANCE FRANCIA
Tel : (33(0)4) 67.59.37.12 – Fax : (33(0)4) 67.59.37.98
Email : dominique.martinez@cirad.fr

Dermatose nodulaire contagieuse – Lumpy skin disease – Dermatitis nodular contagiosa

Dr Gertruida H. Gerdes

Onderstepoort Veterinary Institute
Private Bag X05, Onderstepoort 0110
AFRIQUE DU SUD SOUTH AFRICA SUDÁFRICA
Tel : (27.12) 529.91.17 – Fax : (27.12) 529.94.18
Email : oneillm@arc.agric.za

Dr Eeva Tuppurainen

Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory
Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1483) 23.24.41 – Fax : (44.1483) 23.24.48
Email : eeva.tuppurainen@bbsrc.ac.uk

Diarrhée virale bovine – Bovine viral diarrhoea – Diarrea viral bovina

Dr Peter D. Kirkland

Elizabeth Macarthur Agriculture Institute (EMAI)
AUSTRALIE AUSTRALIA AUSTRALIA
Tel.: (61-2) 46.40.63.31 – Fax : (61-2) 46.40.64.29
E-mail : peter.kirkland@dpi.nsw.gov.au

Dr Dirk Dereg

Canadian Food Inspection Agency, Animal Diseases Research Institute
P.O. Box 640, Lethbridge, Alberta T1J 3Z4
CANADA CANADA CANADÁ
Tel : (1.403) 382.55.00 – Fax : (1.403) 381.12.02
Email : deregtd@inspection.gc.ca

Dr Trevor W. Drew

Head of Virology Department, VLA Weybridge
Woodham Lane, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1932) 35.76.37 – Fax : (44.1932) 35.72.39
Email : t.w.drew@vla.defra.gsi.gov.uk

Dourine – Dourine – Durina

Prof. Vyacheslav T. Zablotsky

All-Russian Research Institute for Experimental Veterinary Medicine (VIEV), Veterinary Dept, Ministry of Agriculture and Food, Kuzminki, 109472 Moscow
RUSSIE RUSSIA RUSIA
Tel : (7.095) 785.84.27 – Fax : (7.095) 970.03.69
Email : efzabagina@mtu-net.ru

Echinococcose/hydatidose – Echinococcosis/hydatidosis – Equinococosis/hidatidosis

Prof. Masao Kamiya

Laboratory of Environmental Zoology, Department of Biosphere and Environmental Sciences,
Faculty of Environmental Systems, Rakuno-Gakuen University
Midori-machi 582, Ebetsu 069-8501
JAPON JAPAN JAPÓN
Tel : (81.11) 388.49.09 – Fax : (81.11) 388.49.09
Email : mkamiya@rakuno.ac.jp

Prof. Allal Dakkak

Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Département de Parasitologie
BP 6202, Rabat-Instituts
MAROC MOROCCO MARRUECOS
Tel : (212.37) 77.64.32 – Fax : (212.37) 77.64.32
Email : a.dakkak@iav.ac.ma

Dr Philip S. Craig

Cestode Zoonoses Research Group, Biosciences Research Institute, University of Salford
Manchester M5 4WT
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.161) 295.54.88 – Fax : (44.161) 295.50.15
Email : p.s.craig@salford.ac.uk

Encéphalomyélite équine de l'Est – Equine encephalomyelitis (Eastern) –Encefalomiélitis equina del Este
Encéphalomyélite équine de l'Ouest – Equine encephalomyelitis (Western) –Encefalomiélitis equina del Oeste

Dr Eileen N. Ostlund

Diagnostic Virology Laboratory, National Veterinary Services Laboratories
P.O. Box 844, Ames, IA 50010
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.515) 663.75.51 – Fax : (1.515) 663.73.48
Email : eileen.n.ostlund@aphis.usda.gov

Encéphalomyélite équine vénézuélienne – Venezuelan equine encephalomyelitis – Encefalomiелitis equina venezolana

Dr Eileen N. Ostlund

Diagnostic Virology Laboratory, National Veterinary Services Laboratories
P.O. Box 844, Ames, IA 50010
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.515) 663.75.51 – Fax : (1.515) 663.73.48
Email : eileen.n.ostlund@aphis.usda.gov

Encéphalopathie et rétinopathie virales – Viral encephalopathy and retinopathy – Encefalopatía y retinopatía virales

Dr Giuseppe Bovo

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Dipartimento di Ittirovirologia,
Via Romea 14/A, 35020 Legnaro PD
ITALIE ITALY ITALIA
Tel : (39.049) 808.42.48 – Fax : (39.049) 808.43.92
Email : gbovo@izsvenezie.it

Dr Toshihiro Nakai

Hiroshima University, Graduate School of Biosphere Science, Laboratory of Fish Pathology
Higashi Hiroshima 739-8528
JAPON JAPAN JAPÓN
Tel : (81.82) 424.79.47 – Fax : (81.82) 424.79.77
Email : nakaitt@hiroshima-u.ac.jp

Encéphalopathie spongiforme bovine – Bovine spongiform encephalopathy – Encefalopatía espongiforme bovina

Dr Stefanie Czub

Canadian Food Inspection Agency, Lethbridge Laboratory
Township Road 9-1, Post Office Box 640, Lethbridge, Alberta
CANADA CANADA CANADÁ
Tel : (1.403) 382.55.49 – Fax : (1.403) 381.12.02
Email : czubs@inspection.gc.ca

Dr Takashi Yokoyama

Prion Diseases Research Unit, National Institute of Animal Health,
National Agricultural Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856
JAPON JAPAN JAPÓN
Tel : (81.298) 38.77.57 – Fax : (81.298) 38.83.32
Email : tyoko@affrc.go.jp

Prof. Andreas Zurbriggen

Institute of Animal Neurology, University of Bern
Bremgartenstrasse 109A, 3012 Bern
SUISSE SWITZERLAND SUIZA
Tel : (41.31) 631.25.09 – Fax : (41.31) 631.25.38
Email : andreas.zurbriggen@itn.unibe.ch

Dr Marion Simmons

VLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1932) 35.95.12 – Fax : (44.1932) 35.73.27
Email : TSEeucrl@vla.defra.gsi.gov.uk

Entérosepticémie du poisson-chat – Enteric septicaemia of catfish – Septicemia entérica del bagre (*Edwardsiella ictaluri*)

Dr Larry A. Hanson

College of Veterinary Medicine, Fish Diagnostic Laboratory, Mississippi State University
P.O. Box 6100, Spring Street, Mississippi 39762
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.662) 325.12.02 – Fax : (1.662) 325.10.31
Email : hanson@cvm.msstate.edu

Épididymite ovine – Ovine epididymitis – Epididimitis ovina (*Brucella ovis*)

Dr Heinrich Neubauer

Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals (BFAV), Institute of Bacterial Infections and Zoonoses
Naumburger Str. 96a, 07743 Jena
ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA
Tel : (49.3641) 80.42.00 – Fax : (49.3641) 80.42.28
Email : heinrich.neubauer@fli.bund.de

Dr Ana Maria Nicola

Gerencia de Laboratorios (GELAB), Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)
Av. Alexander Fleming 1653, 1640 Martínez, Pcia. de Buenos Aires
ARGENTINE ARGENTINA ARGENTINA
Tel : (54.11) 48.36.19.92 – Fax : (54.11) 48.36.19.92
Email : anicola@senasa.gov.ar

Dr Klaus Nielsen

Canadian Food Inspection Agency, Animal Diseases Research Institute
P.O. Box 11300, Station H, Nepean, Ontario K2H 8P9
CANADA CANADA CANADA
Tel : (1.613) 228 66 98 – Fax : (1.613) 228 66 67
Email : nielsenk@inspection.gc.ca

Dr Bruno Garin-Bastuji

AFSSA Alfort, Unité Zoonoses Bactériennes, Lab. OIE/FAO de référence pour la brucellose animale, Laboratoire d'études et de recherches en pathologie animale et zoonoses
23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex
FRANCE FRANCE FRANCIA
Tel : (33 (0)1) 49 77 13 00 – Fax : (33 (0)1) 49 77 13 44
Email : b.garin-bastuji@afssa.fr

Dr Menachem Banai

Kimron Veterinary Institute
Department of Bacteriology, P.O. Box 12, Beit Dagan 50250
ISRAËL ISRAEL ISRAEL
Tel : (972.3) 968 16 98 – Fax : (972.3) 968 17 53
Email : menachemba@moag.gov.il

Dr Massimo Scacchia

CESME, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', National Centre for Exotic Diseases
Via Campo Boario, 64100 Teramo
ITALIE ITALY ITALIA
Tel : (390.861) 33.24.05 – Fax : (390.861) 33.22.51
Email : m.scacchia@izs.it

Dr Judy A. Stack

VLA Weybridge
New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1932) 34 11 11 – Fax : (44.1932) 34 70 46
Email : j.a.stack@vla.defra.gsi.gov.uk

Escherichia coli* – *Escherichia coli* – *Escherichia coli

Dr John Morris Fairbrother

The *Escherichia coli* Laboratory (EcL), 3200 Sicotte Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6
CANADA CANADA CANADA
Tel : (1.450) 773.85.21 – Fax : (1.450) 778.81.08
Email : john.morris.fairbrother@umontreal.ca

Fièvre aphteuse – Foot and mouth disease – Fiebre aftosa

Dr Rahana M. Dwarka

Onderstepoort Veterinary Institute, Team Leader : Exotic Animal Health, Exotic Diseases Division
Private Bag X05, Onderstepoort 0110
AFRIQUE DU SUD SOUTH AFRICA SUDÁFRICA
Tel.: (27-12) 529.95.89 ; Fax : (27-12) 529.95.43
E-mail : DwarkaR@arc.agric.za

Fièvre aphteuse – Foot and mouth disease – Fiebre aftosa

Dr Eduardo D. Maradei

Laboratorio de Fiebre Aftosa de la Dirección de Laboratorios y Control Técnico
Av. Sir. Alexander Fleming 1653, Martinez (1640), Buenos Aires
ARGENTINA ARGENTINE ARGENTINA
Tel./Fax : (+54-11) 4836.1115/0066
E-mail : dilab@senasa.gov.ar

Dr Onkabetse George Matlho

Botswana Vaccine Institute, Department of Animal Health and Production
Broadhurst Industrial Site, Lejara Road, Private Bag 0031, Gaborone
BOTSWANA BOTSWANA BOTSUANA
Tel : (267) 391.27.11 – Fax : (267) 395.67.98
Email : gmatlho@bvi.co.bw

Dr Ingrid Bergmann

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa OPS/OMS
Av. President Kennedy 7778, Sao Bento, Duque de Caxias, ZC 20054-40 Rio de Janeiro
BRÉSIL BRAZIL BRASIL
Tel : (55.21) 36.61.90.56 – Fax : (55.21) 36.61.90.01
Email : ibergman@panaftosa.ops-oms.org

Dr Jef. M. Hammond

Institute for Animal Health
Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1483) 23.24.41 – Fax : (44.1483) 23.24.48
Email : david.paton@bbsrc.ac.uk

Dr Valery M. Zakharov

Federal Governmental Institute, Centre for Animal Health, FGI-ARRIAH, 600900 Vladimir, Yur'evets
RUSSIE RUSSIA RUSSIA
Tel : (4922) 26.19.14/26.06.14/26.38.77 – Fax : (4922) 26.19.14/26.06.14/26.38.77
Email : mail@arriah.ru

Fièvre catarrhale du mouton – Bluetongue – Lengua azul

Dr Gertruida H. Gerdes

Onderstepoort Veterinary Institute, Private Bag X05, Onderstepoort 0110
AFRIQUE DU SUD SOUTH AFRICA SUDÁFRICA
Tel : (27.12) 529.91.17 – Fax : (27.12) 529.94.18
Email : oneillm@arc.agric.za

Dr Peter Daniels

CSIRO, Australian Animal Health Laboratory (AAHL)
5 Portarlington Road, Private Bag 24, Geelong 3220, Victoria
AUSTRALIE AUSTRALIA AUSTRALIA
Tel : (61.3) 52.27.50.00 – Fax : (61.3) 52.27.55.55
Email : peter.daniels@csiro.au

Dr Eileen N. Ostlund

Diagnostic Virology Laboratory, National Veterinary Services Laboratories
P.O. Box 844, Ames, IA 50010
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.515) 663.75.51 – Fax : (1.515) 663.73.48
Email : eileen.n.ostlund@aphis.usda.gov

Dr Giovanni Savini

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale'
Via Campo Boario, 64100 Teramo
ITALIE ITALY ITALIA
Tel : (39.0861) 33.24.40 – Fax : (39.0861) 33.22.51
Email : g.savini@izs.it

Prof. Philip S. Mellor

Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory
Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1483) 23.24.41 – Fax : (44.1483) 23.24.48
Email : philip.mellor@bbsrc.ac.uk

Fièvre charbonneuse – Anthrax – Carunco bacteridiano

Dr Belly Golsteyn-Thomas

Canadian Food Inspection Agency, PO Box 640, Township Rd 9-1, Lethbridge, Alberta T1J 3Z4
CANADA CANADA CANADA
Tel : (1.403) 382.55.51 – Fax : (1.403) 381.12.02
Email : belly.golsteyn-Thomas@inspection.gc.ca

Dr Ginger R. Harvey

National Veterinary Services Laboratories, P.O. Box 844, Ames, IA 50010
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.515) 663.75.65 – Fax : (1.515) 663.75.69
Email : ginger.r.harvey@aphis.usda.gov

Fièvre de la Vallée du Rift – Rift Valley fever – Fiebre del Valle del Rift

Dr Gertruida H. Gerdes

Onderstepoort Veterinary Institute, Private Bag X05, Onderstepoort 0110
AFRIQUE DU SUD SOUTH AFRICA SUDÁFRICA
Tel : (27.12) 529.91.17 – Fax : (27.12) 529.94.18
Email : oneillm@arc.agric.za

Fièvre de West Nile – West Nile Fever – Fiebre del Nilo Occidental

Dr Eileen N. Ostlund

Diagnostic Virology Laboratory, National Veterinary Services Laboratories, P.O. Box 844, Ames, IA 50010
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.515) 663.75.51 – Fax : (1.515) 663.73.48
Email : eileen.n.ostlund@aphis.usda.gov

Gastro-entérite transmissible – Transmissible gastroenteritis – Gastroenteritis transmissible

Dr Linda J. Saif

Food Animal Health Research Program, Ohio Agricultural Research and Development Center, The Ohio State University, 1680 Madison Avenue, Wooster, OH 44691-4096
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.330) 263.37.44 – Fax : (1.330) 263.36.77
Email : saif.2@osu.edu

Grippe équine – Equine influenza – Gripe equina

Dr Werner Eichhorn

Institute for Medical Microbiology, Infectious and Epidemic Diseases
Veterinary Faculty, Ludwig-Maximilians-University, Veterinärstrasse 13, 80539 München
ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA
Tel : (49.89) 21.80.25.31 – Fax : (49.89) 21.80.59.03
Email : werner.eichhorn@micro.vetmed.uni-muenchen.de

Dr Thomas M. Chambers

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 UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.859) 257.47.57 – Fax : (1.859) 257.85.42
Email : tmcham1@uky.edu

Dr Jennifer A. Mumford⁽¹⁾

Animal Health Trust, Lanwades Park, Kentford, Newmarket, Suffolk CB8 7UU
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.8700) 50.24.60 – Fax : (44.8700) 50.24.61
Email : jenny.mumford@aht.org.uk

Dr Jennifer A. Mumford⁽²⁾

Cambridge Infectious Diseases Consortium, Department of Veterinary Medicine
Maddingley Road, Cambridge CB3 0ES
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1223) 76.46.66 – Fax : (44.1223) 76.46.67
Email : jam80@hermes.cam.ac.uk

Gyrodactylose – Gyrodactylus – Girodactilosis (*Gyrodactylus salaris*)

Dr Tor-Atle Mo

National Veterinary Institute, Fish Health Section
Ullevålsveien 68, P.O. Box 8156 Dep., 0033 Oslo
NORVÈGE NORWAY NORUEGA
Tel : (47.23) 21.61.10 – Fax : (47.23) 21.61.01
Email : tor-atle.mo@vetinst.no

Herpès-virose de la carpe koï – Koi herpesvirus disease – Herpesvirosis de la carpa koi

Dr Motohiko Sano

Fisheries Research Agency, Research Promotion and Development Department, Yokohama 220-6115
JAPON JAPAN JAPÓN
Tel : (81.45) 227.26.77 – Fax : (81.45) 227.27.03
Email : sanogen@fra.affrc.go.jp

Dr Keith Way

The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), Weymouth Laboratory
Barrack Road, The Nothe, Weymouth, Dorset, DT4 8UB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1305) 20.66.39 – Fax : (44.1305) 20.66.01
Email : keith.way@cefass.co.uk

Herpès-virose du poisson-chat – Channel catfish virus disease – Virosis del bagre de canal

Dr Larry A. Hanson

College of Veterinary Medicine, Fish Diagnostic Laboratory, Mississippi State University
P.O. Box 6100, Spring Street, Mississippi 39762
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.662) 325.12.02 – Fax : (1.662) 325.10.31
Email : hanson@cvm.msstate.edu

Herpès-virose du saumon *masou* – *Oncorhynchus masou* virus disease – Herpesvirosis del salmón *masou*

Dr Mamoru Yoshimizu

Laboratory of Microbiology, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Faculty of Fisheries,
Microbiology Department
3-1-1 Minato-cho, Hakodate, Hokkaido 0418611-8611
JAPON JAPAN JAPÓN
Tel : (81.138) 40.88.10 – Fax : (81.138) 40.88.10
Email : yosimizu@fish.hokudai.ac.jp

**Infection à *Bonamia exitiosa* – Infection with *Bonamia exitiosa* – Infección por *Bonamia exitiosa*
Infection à *Bonamia ostreae* – Infection with *Bonamia ostreae* – Infección por *Bonamia ostreae***

Dr Isabelle Arzul

IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, BP 133, 17390 La Tremblade
FRANCE FRANCE FRANCIA
Tel : (33-5) 46.76.26.10 – Fax : (33-5) 46.76.26.11
Email : isabelle.arzul@ifremer.fr

Infection à *Haplosporidium nelsoni* – Infection with *Haplosporidium nelsoni* – Infección por *Haplosporidium nelsoni*

Dr Eugene M. Burrenson

Director for Research and Advisory Services, Virginia Institute of Marine Science, College of William and Mary
P.O. Box 1346, Gloucester Point, VA 23062
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.804) 684.70.15 – Fax : (1.804) 684.77.96
Email : gene@vims.edu

**Infection à *Marteilia refringens* – Infection with *Marteilia refringens* – Infección por *Marteilia refringens*
Infection à *Marteilia sydneyi* – Infection with *Marteilia sydneyi* – Infección por *Marteilia sydneyi***

Dr Isabelle Arzul

IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, BP 133, 17390 La Tremblade
FRANCE FRANCE FRANCIA
Tel : (33-5) 46.76.26.10 – Fax : (33-5) 46.76.26.11
Email : isabelle.arzul@ifremer.fr

Infection à *Mikrocytos mackini* – Infection with *Mikrocytos mackini* – Infección por *Mikrocytos mackini*

Dr Susan Bower

Department of Fisheries and Oceans Pacific Biological Station
3190 Hammond Bay Road, Nanaimo, British Columbia V9T 6N7
CANADA CANADA CANADÁ
Tel : (1.250) 756.70.77 – Fax : (1.250) 756.70.53
Email : bowers@dfo-mpo.gc.ca

**Infection à *Perkinsus marinus* – Infection with *Perkinsus marinus* – Infección por *Perkinsus marinus*
Infection à *Perkinsus olseni* – Infection with *Perkinsus olseni* – Infección por *Perkinsus olseni***

Dr Eugene M. Bureson

Director for Research and Advisory Services, Virginia Institute of Marine Science, College of William and Mary
P.O. Box 1346, Gloucester Point, VA 23062
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.804) 684.70.15 – Fax : (1.804) 684.77.96
Email : gene@vims.edu

Infection à *Xenohaliotis californiensis* – Infection with *Xenohaliotis californiensis* – Infección por *Xenohaliotis californiensis*

Prof. Carolyn Friedman

Friedman Shellfish Health Laboratory, School of Aquatic and Fishery Sciences, University of Washington
Box 355020, Seattle, Washington 98195
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.206) 543.95.19 – Fax : (1.206) 616.86.89
Email : carolynf@u.washington.edu

Influenza aviaire hautement pathogène et influenza aviaire faiblement pathogène (volailles) – Highly pathogenic avian influenza and low pathogenic avian influenza (poultry) – Influenza aviar altamente patógena e influenza aviar levemente patógena (aves de corral)

Dr Timm C. Harder

Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals (BFAV), Institute of Diagnostic Virology
Boddenblick 5a, 17493 Greifswald - Insel Riems
ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA
Tel : (49.383) 51.71.96 – Fax : (49.383) 51.72.75
Email : timm.harder@fli.bund.de

Dr Paul W. Selleck

CSIRO, Australian Animal Health Laboratory (AAHL)
5 Portarlington Road, Private Bag 24, Geelong 3220, Victoria
AUSTRALIE AUSTRALIA AUSTRALIA
Tel : (61.3) 52.27.50.00 – Fax : (61.3) 52.27.55.55
Email : paul.selleck@csiro.au

Dr John Pasick

Canadian Food Inspection Agency, National Centre for Foreign Animal Disease
1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba R3E 3M4
CANADA CANADA CANADÁ
Tel : (1.204) 789.20.13 – Fax : (1.204) 789.20.38
Email : jpasick@inspection.gc.ca

Influenza aviaire hautement pathogène et influenza aviaire faiblement pathogène (volailles) – Highly pathogenic avian influenza and low pathogenic avian influenza (poultry) – Influenza aviar altamente patógena e influenza aviar levemente patógena (aves de corral)

Dr Hualan Chen

Harbin Veterinary Research Institute
427 Maduan Street, Harbin 150001,
CHINE (RÉP. POPULAIRE DE) CHINA (PEOPLE'S REP. OF) CHINA (REP. POP. DE)
Tel.: (86-451) 8593.5006 – Fax : (86-451) 8273.3132
Email : hlchen@hvri.ac.cn, hlchen1@yahoo.com – Website: <http://hvri.ac.cn>

Dr Brundaban Panigrahy

National Veterinary Services Laboratories
P.O. Box 844, Ames, IA 50010
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.515) 663.75.51 – Fax : (1.515) 663.73.48
Email : brundaban.panigrahy@aphis.usda.gov

Dr Ilaria Capua

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio Virologia
Via Romea 14/A, 35020 Legnaro, Padova
ITALIE ITALY ITALIA
Tel : (39.049) 808.43.79 – Fax : (39.049) 808.43.60
Email : icapua@izsvenezie.it

Dr Hiroshi Kida

Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Department of Disease Control
Kita-18, Nishi-9, Kita-ku, Sapporo 060-0818
JAPON JAPAN JAPÓN
Tel : (81.11) 706.52.07 – Fax : (81.11) 706.52.73
Email : kida@vetmed.hokudai.ac.jp

Dr Ian Brown

VLA Weybridge
New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1932) 34.11.11 – Fax : (44.1932) 34.70.46
Email : i.h.brown@vla.defra.gsi.gov.uk

Iridovirose de la daurade japonaise – Red sea bream iridoviral disease – Iridovirus de la dorada japonesa

Dr Kazuhiro Nakajima

Fisheries Research Agency, Headquarters
Queen's Tower B 15F, 2-3-3 Minatomirai, Nishi-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 220-6115
JAPON JAPAN JAPÓN
Tel : (81.45) 277.26.77 – Fax : (81.45) 227.27.03
Email : rsiv-lab@fra.affrc.go.jp

Leptospirose – Leptospirosis – Leptospirosis

Dr Luis E. Samartino⁽¹⁾

Instituto de Bacteriología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (CICV), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)
Castelar, Casilla de Correo 77, 1708 Morón, Pcia. de Buenos Aires
ARGENTINE ARGENTINA ARGENTINA
Tel : (54.11) 46.21.12.89 – Fax : (54.11) 46.21.17.12
Email : lsanma@correo.inta.gov.ar

Dr Gleyre T.D. de Mazzonelli⁽²⁾

Gerencia de Laboratorios (GELAB), Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)
Av. Alexander Fleming 1653, 1640 Martínez, Pcia. de Buenos Aires
ARGENTINE ARGENTINA ARGENTINA
Tel : (54.11) 48.36.19.92 – Fax : (54.11) 48.36.19.92
Email : dilab@senasa.gov.ar/gmazzone@senasa.gov.ar

Leptospirose – Leptospirosis – Leptospirosis

Dr Lee D. Smythe

WHO/FAO/OIE Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Western Pacific Region,
Queensland Health Scientific Services
39 Kessels Road, Coopers Plains, P.O. Box 594, Archerfield, Queensland 4108
AUSTRALIE AUSTRALIA AUSTRALIA
Tel : (61.7) 32.74.90.64 – Fax : (61.7) 32.74.91.75
Email : lee_smythe@health.qld.gov.au

Dr Mark Wilson

National Veterinary Services Laboratories
P.O. Box 844, Ames, IA 50010
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.515) 663.73.42 – Fax : (1.515) 663.76.73
Email : mark.a.wilson@aphis.usda.gov

Dr Rudolf A. Hartskeerl

Royal Tropical Institute, N.H. Swellengrebel Laboratory of Tropical Hygiene, Division of Health, Department of
Biomedical Research
Meibergdreef 39, 1105 AZ Amsterdam
PAYS-BAS THE NETHERLANDS PAÍSES BAJOS
Tel : (31.20) 566.54.38 – Fax : (31.20) 697.18.41
Email : r.hartskeerl@kit.nl

Dr William A. Ellis

Department of Agriculture, Veterinary Sciences Division
Stoney Road, Stormont, Belfast BT4 3SD, Northern Ireland
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.2890) 52.56.00 – Fax : (44.2890) 52.57.55
Email : bill.ellis@afbini.gov.uk

Leucose bovine enzootique – Enzootic bovine leukosis – Leucosis bovina enzoótica

Dr Thomas W. Vahlenkamp

Friedrich-Loeffler-Institute
Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems
ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA
Tel : (+49-38351) 7172 – Fax : (49-38351) 7151
Email : thomas.vahlenkamp@fli.bund.de

Dr Jacek Kuzmak

National Veterinary Research Institute
Spartyzantow str. 57, 24-100 Pulawy
POLOGNE POLAND POLONIA
Tel.: (48-81) 886.30.51 – Fax : (+48-81) 886.25.95;
E-mail : jkuzmak@piwet.pulawy.pl

Mr Chris Venables

VLA Weybridge
New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1932) 34.11.11 – Fax : (44.1932) 34.70.46
Email : c.venables@vla.defra.gsi.gov.uk

Loque américaine des abeilles mellifères – American foulbrood of honey bees– Loque americana de las abejas melíferas

Dr Adriana M. Alippi

Laboratorio de Loque Americana de la Unidad de Bacteriología del Centro de Investigaciones en Fitopatología
(CIDEFI), La Plata,
ARGENTINE ARGENTINA ARGENTINA
Tel.: (54-221) 423 6758 ext. 423 – Fax : (54-221) 425.2346
E-mail : adrianaalippi@gmail.com ; alippi@biol.unlp.edu.ar

Maedi-visna – Maedi-visna – Maedi-visna

Dr Don P. Knowles, Jr

Animal Diseases Research Unit, USDA, ARS, Washington State University
Pullman, Washington 99164-7030
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.509) 335.60.22 – Fax : (1.509) 335.83.28
Email : dknowles@vetmed.wsu.edu

Dr Stephen Valas

Laboratoire d'étude et de recherches caprines
60 rue du Pied de Fond, B.P. 3081, 79000 Niort
FRANCE FRANCE FRANCIA
Tel : (33) (0)5 49.79.61.28 – Fax : (33) (0)5 49 79 42 19
Email : s.valas@niort.afssa.fr

Maladie d'Aujeszky – Aujeszky's disease – Enfermedad de Aujeszky

Dr Sabrina L. Swenson

National Veterinary Services Laboratories, P.O. Box 844, Ames, IA 50010
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.515) 663.75.51 – Fax : (1.515) 663.73.48
Email : sabrina.l.swenson@aphis.usda.gov

Dr Philippe Vannier

AFSSA Ploufragan, Laboratoire d'études et de recherches avicoles et porcines, UR Station de pathologie porcine
Zoopôle Beaucemaine-Les Croix, BP 53, 22440 Ploufragan
FRANCE FRANCE FRANCIA
Tel : (33 (0)2) 96.01.62.22 – Fax : (33 (0)2) 96.01.62.23
Email : p.vannier@afssa.fr

Dr Andrée T.J. Bianchi

Central Veterinary Institute of Wageningen UR (CVI)
P.O. Box 2004, 8203 AA Lelystad
PAYS-BAS THE NETHERLANDS PAÍSES BAJOS
Tel : (31.320) 23.88.00 – Fax : (31.320) 23.86.68
Email : andre.bianchi@wur.nl

Maladie de la tête jaune – Yellowhead disease – Enfermedad de la cabeza amarilla

Dr Peter Walker

CSIRO, Aquaculture and Aquatic Animal Health (AAHL)
5 Portarlington Road, Private Bag 24, Geelong 3220, Victoria
AUSTRALIE AUSTRALIA AUSTRALIA
Tel : (61.3) 52.27.54.65 – Fax : (61.3) 52.27.55.55
Email : peter.walker@csiro.au

Maladie de Marek – Marek's disease – Enfermedad de Marek

Dr Aly M. Fadly

USDA, ARS, Avian Disease and Oncology Laboratory
33606 East Mount Hope Road, East Lansing, Michigan 48823
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.517) 337.68.29 – Fax : (1.517) 337.67.76
Email : fadly@msu.edu

Dr Venugopal K. Nair

Institute for Animal Health, Compton Laboratory, Compton
Newbury, Berkshire RG20 7NN
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1635) 57.84.11 – Fax : (44.1635) 57.72.63
Email : venu.gopal@bbsrc.ac.uk

Maladie de Newcastle – Newcastle disease – Enfermedad de Newcastle

Dr Christian Grund

Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals (BFAV), Institute of Diagnostic Virology
Boddenblick 5a, 17493 Greifswald - Insel Riems
ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA
Tel : (49.383) 51.71.96 – Fax : (49.383) 51.72.75
Email : christian.grund@fli.bund.de

Dr Paul W. Selleck

CSIRO, Australian Animal Health Laboratory (AAHL)
5 Portarlington Road, Private Bag 24, Geelong 3220, Victoria
AUSTRALIE AUSTRALIA AUSTRALIA
Tel : (61.3) 52.27.50.00 – Fax : (61.3) 52.27.55.55
Email : paul.selleck@csiro.au

Dr Brundaban Panigrahy

National Veterinary Services Laboratories, P.O. Box 844, Ames, IA 50010
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.515) 663.75.51 – Fax : (1.515) 663.73.48
Email : brundaban.panigrahy@aphis.usda.gov

Dr Ilaria Capua

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio Virologia
Via Romea 14/A, 35020 Legnaro, Padova
ITALIE ITALY ITALIA
Tel : (39.049) 808.43.79 – Fax : (39.049) 808.43.60
Email : icapua@izsvenezie.it

Dr Ian Brown

VLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1932) 34.11.11 – Fax : (44.1932) 34.70.46
Email : i.h.brown@vla.defra.gsi.gov.uk

Maladie des points blancs – White spot disease – Enfermedad de las manchas blancas

Prof. Donald V. Lightner

Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona
Building 90, Room 202 Pharmacy/Microbiology, Tucson, AZ 85721
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.520) 621.84.14 – Fax : (1.520) 621.48.99
Email : dvl@u.arizona.edu

Dr Grace Lo

Department and Institute of Zoology, National Taiwan University, 1, Sec. Roosevelt Road, Taipei
TAIPEI CHINOIS TAIPEI CHINA TAIPEI CHINO
Tel : (886.2) 23.63.35.62 – Fax : (886.2) 23.63.81.79
Email : gracelow@ccms.ntu.edu.tw

Maladie des queues blanches – West tail disease – Enfermedad de la cola blanca

Dr A. Sait Sahul Hameed

C.Abdul Hakeem College, Aquaculture Biotechnology Division, Department of Zoology
Melvisharam-632 509, Vellore Dt. Tamil Nadu
INDE INDIA INDIA
Tel : (91-4172) 26 94 87 – Fax : (91-4172) 26 94 87
E-mail : cah_sahul@hotmail.com

Maladie hémorragique du lapin – Rabbit haemorrhagic disease – Enfermedad hemorrágica del conejo

Dr Lorenzo Capucci

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, 'B. Ubertini'
Via A. Bianchi n° 7/9, 25124 Brescia
ITALIE ITALY ITALIA
Tel : (39.30) 229.03.08 – Fax : (39.30) 229.05.59
Email : lcapucci@bs.izs.it

Maladies des abeilles – Bee diseases – Enfermedades de las abejas

Dr Wolfgang Ritter

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg
P.O.B. 100462, 79123 Freiburg
ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA
Tel : (49.761) 150.21.75 – Fax : (49.761) 150.22.99
Email : wolfgang.ritter@cvuafr.bwl.de

M 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 FRANCE FRANCIA
Tel : (33 (0)4) 92.94.37.13 – Fax : (33 (0)4) 92.94.37.01
Email : jp.faucon@sophia.afssa.fr

Maladies dues aux virus Hendra et Nipah – Hendra and Nipah virus diseases – Enfermedades causadas por los virus Hendra y Nipah

Dr Peter Daniels

CSIRO, Australian Animal Health Laboratory (AAHL)
5 Portarlington Road, Private Bag 24, Geelong 3220, Victoria
AUSTRALIE AUSTRALIA AUSTRALIA
Tel : (61.3) 52.27.50.00 – Fax : (61.3) 52.27.55.55
Email : peter.daniels@csiro.au

Maladie vésiculeuse du porc – Swine vesicular disease – Enfermedad vesicular porcina

Dr Emiliana Brocchi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna 'B. Ubertini'
Via A. Bianchi n° 9, 25124 Brescia
ITALIE ITALY ITALIA
Tel : (39.030) 229.03.10 – Fax : (39.030) 229.03.69
Email : emiliana.brocchi@bs.izs.it

Dr Jef M. Hammond

Institute for Animal Health
Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1483) 23.12.11 – Fax : (44.1483) 23.26.21
Email : jef.hammond@bbsrc.ac.uk

Métrite contagieuse équine – Contagious equine metritis – Metritis contagiosa equina

Dr Brenda MorningstarShaw

National Veterinary Services Laboratories
P.O. Box 844, Ames, IA 50010
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.515) 663.75.65 – Fax : (1.515) 663.75.69
Email : brenda.r.morningstar@aphis.usda.gov

Dr Hendrik-Jan Roest

Central Veterinary Institute of Wageningen UR (CVI), P.O. Box 2004, 8203 AA Lelystad
PAYS-BAS THE NETHERLANDS PAÍSES BAJOS
Tel : (31.320) 23.80.26 – Fax : (31.320) 23.81.53
Email : hendrikjan.roest@wur.nl

Métrite contagieuse équine – Contagious equine metritis – Metritis contagiosa equina

Dr Paul Todd

VLA Bury St Edmunds
Rougham Hill, Bury St Edmunds, Suffolk IP33 2RY
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44-1284) 72.44.99 – Fax : (44-1284) 72.45.00
Email : p.todd@vla.defra.gsi.gov.uk

Morve – Glanders – Muermo

Dr Henrich Neubauer

Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals (BFAV), Institute of Bacterial Infections and Zoonoses
Naumburger Str. 96a, 07743 Jena
ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA
Tel : (49.3641) 80.42.00 – Fax : (49.3641) 80.42.28
Email : heinrich.neubauer@fli.bund.de

Mycoplasmosse aviaire – Avian mycoplasmosis – Micoplasmosis aviar (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*)

Dr Naola Ferguson-Noel

The University of Georgia, Poultry Diagnostic and Research Center
953 College Station Rd, Athens, Georgia 30602-4875
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.706) 542.30.86 – Fax : (1.706) 542.56.30
Email : naolaf@uga.edu

Myiase à *Cochliomyia hominivorax* – New world screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) – Miasis por *Cochliomyia hominivorax*

Dr Agustín Sagel

COPEG (Panama-US Commission for the Eradication and Prevention of NWS)
Apartado Postal 0816-07636
PANAMA PANAMA PANAMÁ
Tel : (507) 232.60.44 – Fax : (507) 232.61.92
Email : veter56@yahoo.com, tinso24@hotmail.com ou asagel@copeg.org

Nécrose hématopoïétique épizootique – Epizootic haematopoietic necrosis – Necrosis hematopoyética epizootica

Dr Alex Hyatt⁽¹⁾

CSIRO, Australian Animal Health Laboratory (AAHL)
5 Portarlington Road, Private Bag 24, Geelong 3220, Victoria
AUSTRALIE AUSTRALIA AUSTRALIA
Tel : (61.3) 52.27.50.00 – Fax : (61.3) 52.27.55.55
Email : alex.hyatt@csiro.au

Dr Richard Whittington⁽²⁾

Chair Farm Animal Health, Faculty of Veterinary Science, University of Sydney
425 Werombi Road, Private Bag 3, Camden NSW 2570
AUSTRALIE AUSTRALIA AUSTRALIA
Tel : (61.2) 93.51.16.19 – Fax : (61.2) 93.51.16.18
Email : richardw@camden.usyd.edu.au

Nécrose hématopoïétique infectieuse – Infectious haematopoietic necrosis – Necrosis hematopoyética infecciosa

Dr James R. Winton

Western Fisheries Research Center
6505 N.E. 65th Street, Seattle, Washington 98115
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.206) 526.65.87 – Fax : (1.206) 526.66.54
Email : jim_winton@usgs.gov

**Nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse – Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis –
Necrosis hipodérmica u hematopoyética infecciosa**

Prof. Donald V. Lightner

Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona
Building 90, Room 202 Pharmacy/Microbiology, Tucson, AZ 85721
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.520) 621.84.14 – Fax : (1.520) 621.48.99
Email : dvl@u.arizona.edu

Nécrose musculaire infectieuse – Infectious myonecrosis – Mionecrosis infecciosa

Prof. Donald V. Lightner

Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona
Building 90, Room 202 Pharmacy/Microbiology, Tucson, AZ 85721

ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Tel : (1.520) 621.84.14 – Fax : (1.520) 621.48.99

Email : dvl@u.arizona.edu

Paratuberculose – Paratuberculosis – Paratuberculosis

Dr Bernardo Alonso

Gerencia de Laboratorios (GELAB) del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad, Agroalimentaria (SENASA)
Av. Alexander Fleming 1653, 1640 Martinez - Pcia de Buenos Aires

ARGENTINE ARGENTINA ARGENTINA

Tel : (54.11) 48.36.00.36 – Fax : (54.11) 48.36.00.36

Email : balonso@senasa.gov.ar ou dilab@inea.com.ar

Dr Jacek Gwozdz

Johne's Disease Laboratory, Research and Development Division, Department of Primary Industries
475 Mickleham Road, Attwood, Victoria 3049

AUSTRALIE AUSTRALIA AUSTRALIA

Tel : (61.3) 92.17.42.00 – Fax : (61.3) 92.17.42.99

Email : jacek.gwozdz@dpi.vic.gov.au

Mme Maria Laura Boschioli-Cara

AFSSA Alfort, Unité Zoonoses Bactériennes, Laboratoire d'études et de recherches en pathologie animale et zoonoses

23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex

FRANCE FRANCE FRANCIA

Tel : (33 (0)1) 49.77.13.00 – Fax : (33 (0)1) 49.77.13.44

Email : ml.boschioli@afssa.fr

Dr Ivo Pavlik

Veterinary Research Institute

Hudcova 70, 62132 Brno

TCHÈQUE (Rép.) CZECH (Rep.) CHECA (Rep.)

Tel : (420.5) 33.33.16.01 – Fax : (420.5) 33.33.12.29

Email : pavlik@vri.cz

Péripneumonie contagieuse bovine – Contagious bovine pleuropneumonia – Perineumonía contagiosa bovina

Dr François Poumarat⁽¹⁾

AFSSA Lyon, Laboratoire de pathologie bovine

31 avenue Tony Garnier, BP 7033, 69342 Lyon Cedex 07

FRANCE FRANCE FRANCIA

Tel : (33 (0)4) 78.72.65.43 – Fax : (33 (0)4) 78.61.91.45

Email : f.poumarat@lyon.afssa.fr

Dr François Thiaucourt⁽²⁾

CIRAD-EMVT, Programme Santé animale TA 30/G

Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5

FRANCE FRANCE FRANCIA

Tel : (33(0)4) 67.59.37.24 – Fax : (33(0)4) 67.59.37.98

Email : thiaucourt@cirad.fr

Dr Attilio Pini

CESME, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale'

Via Campo Boario, 64100 Teramo

ITALIE ITALY ITALIA

Tel : (39.0861) 33.22.28 – Fax : (39.0861) 33.22.51

Email : a.pini@izs.it

Dr Ana Rosa Pombo Botelho

Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV)

Estrada de Benfica 701, 1500 Lisboa

PORTUGAL PORTUGAL PORTUGAL

Tel : (351.21) 711.53.33/39/40 – Fax : (351.21) 711.52.36

Email : ana.botelho@lniv.min-agricultura.pt

Peste bovine – Rinderpest – Peste bovina

Dr Geneviève Libeau

CIRAD/EMVT

Programme Santé animale, TA 30/G Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5

FRANCE FRANCE FRANCIA

Tel : (33 (0)4) 67.59.37.98 – Fax : (33 (0)4) 67.59.38.50

Email : genevieve.libeau@cirad.fr

Prof. Tom Barrett

Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory

Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF

ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO

Tel : (44.1483) 23.24.41 – Fax : (44.1483) 23.24.48

Email : tom.barrett@bbsrc.ac.uk

Peste de l'écrevisse – Crayfish plague – Plaga del cangrejo de río (*Aphanomyces astaci*)

Dr Birgit Oidtmann

The Centre for Environment, Fisheries, and Aquaculture Science (CEFAS),
Weymouth Laboratory, Barrack Road, The Nothe, Weymouth, Dorset, DT4 8UB

ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO

Tel : (44.1305) 20.66.61 – Fax : (44.1305) 20.66.01

Email : birgit.oidtmann@cefass.co.uk

Peste des petits ruminants – Peste des petits ruminants – Peste de pequeños rumiantes

Dr Geneviève Libeau

CIRAD/EMVT

Programme Santé animale, TA 30/G Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5

FRANCE FRANCE FRANCIA

Tel : (33 (0)4) 67.59.37.98 – Fax : (33 (0)4) 67.59.38.50

Email : genevieve.libeau@cirad.fr

Prof. Tom Barrett

Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF

ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO

Tel : (44.1483) 23.24.41 – Fax : (44.1483) 23.24.48

Email : tom.barrett@bbsrc.ac.uk

Peste équine – African horse sickness – Peste equina

Dr Gertruida H. Gerdes

Onderstepoort Veterinary Institute, Private Bag X05, Onderstepoort 0110

AFRIQUE DU SUD SOUTH AFRICA SUDÁFRICA

Tel : (27.12) 529.91.17 – Fax : (27.12) 529.94.18

Email : oneillm@arc.agric.za

Dr Concepción Gómez-Tejedor Ortiz⁽¹⁾

Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (LCV), Domicilio carretera de Algete, km 8. 28110 Algete (Madrid)

ESPAGNE SPAIN ESPAÑA

Tel : (34.91) 347.9282/9277 – Fax : (34.91) 347.8296

Email : lcv@mapya.es – cgomezte@mapya.es

Dr José Manuel Sánchez-Vizcaíno⁽²⁾

Facultad de Veterinaria, HCV Planta sótano, Universidad Complutense de Madrid

Avda. Puerta de Hierro s/n, Laboratorio de Vigilancia Sanitaria (VISAVET) 28040 Madrid

ESPAGNE SPAIN ESPAÑA

Tel : (34.91) 394.3975 – Fax : (34.91) 394.3795

Email : jmvizcaíno@vet.ucm.es – visavet@vet.ucm.es

Prof. Philip S. Mellor

Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory

Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF

ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO

Tel : (44.1483) 23.24.41 – Fax : (44.1483) 23.24.48

Email : philip.mellor@bbsrc.ac.uk

Peste porcine africaine – African swine fever – Peste porcina africana

Dr Baratang Alison Lubisi

Onderstepoort Veterinary Institute, Exotic Diseases Division, Private Bag X5, Onderstepoort 0110
AFRIQUE DU SUD SOUTH AFRICA SUDÁFRICA
Tel : (27.12) 529.95.60 – Fax : (27.12) 529.95.95
Email : Lubisia@arc.agric.za

Dr José Manuel Sánchez-Vizcaíno

Ministerio de Educación y Ciencia, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid
Avda. Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid
ESPAGNE SPAIN ESPAÑA
Tel : (34.91) 394.40.82 – Fax : (34.91) 394.39.08
Email : jmvizcaíno@vet.ucm.es

Dr Chris Oura

Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1483) 23.24.41 – Fax : (44.1483) 23.24.48
Email : chris.oura@bbsrc.ac.uk

Peste porcine classique – Classical swine fever – Peste porcina clásica

Prof. Volker Moennig

Institute of Virology, Hannover Veterinary School
Bünteweg 17, 30559 Hannover
ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA
Tel : (49.511) 953.88.40 – Fax : (49.511) 953.88.98
Email : volker.moennig@tiho-hannover.de

Dr John Pasick

Canadian Food Inspection Agency, National Centre for Foreign Animal Disease
1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba R3E 3M4
CANADA CANADA CANADA
Tel : (1.204) 789.20.13 – Fax : (1.204) 789.20.38
Email : jpasick@inspection.gc.ca

Dr Shunji Yamada

National Institute of Animal Health
6-20-1 Josui-honcho, Kodaïra, Tokyo, 187-0022
JAPON JAPAN JAPÓN
Tel : (81.42) 321.14.41 – Fax : (81.42) 325.51.22
Email : musasabi@affrc.go.jp

Prof. Dr Zygmunt Pejsak

National Veterinary Research Institute
Partyzantow str. 57, 24-100 Pulawy
POLOGNE POLAND POLONIA
Tel : (48.81) 886.30.51 – Fax : (48.81) 886.25.95
Email : zpejsak@piwet.pulawy.pl

Dr Trevor W. Drew

Head of Virology Department, VLA Weybridge
Woodham Lane, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1932) 35.76.37 – Fax : (44.1932) 35.72.39
Email : t.w.drew@vla.defra.gsi.gov.uk

Piroplasmose équine – Equine piroplasmosis – Piroplasmosis equina

Prof. Ikuo Igarashi

National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine
Inada-cho Nishi 2-13, Obihiro, Hokkaido 080-8555
JAPON JAPAN JAPÓN
Tel : (81.155) 49.56.42 – Fax : (81.155) 49.56.43
Email : igarcpmi@obihiro.ac.jp

Pleuropneumonie contagieuse caprine – Contagious caprine pleuropneumonia – Pleuroneumonía contagiosa caprina

Dr François Thiaucourt

CIRAD-EMVT, Programme Santé animale TA 30/G
Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5
FRANCE FRANCE FRANCIA
Tel : (33(0)4) 67.59.37.24 – Fax : (33(0)4) 67.59.37.98
Email : thiaucourt@cirad.fr

Rage – Rabies – Rabia

Dr Claude Taurai Sabeta

Onderstepoort Veterinary Institute, Rabies Unit
Private Bag X05, Onderstepoort 0110
AFRIQUE DU SUD SOUTH AFRICA SUDÁFRICA
Tel : (27.12) 529.94.39 – Fax : (27.12) 529.93.90
Email : sabetac@arc.agric.za

Dr Thomas Müller

Institute of Epidemiology, Friedrich-Loeffler Institut, Federal Research Institute for Animal Health
Seest. 55, 16868 Wusterhausen/Dosse
ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA
Tel : (49.33) 97.98.01.86 – Fax : (49.33) 97.98.02.00
Email : thomas.mueller@wus.bfav.de

Dr Alexander Wandeler

Centre of Expertise for Rabies, Animal Diseases Research Institute
3851 Fallowfield Road, P.O. Box 11300, Station H, Nepean, Ontario K2H 8P9
CANADA CANADA CANADÁ
Tel : (1.613) 228.66.98 – Fax : (1.613) 228.66.69
Email : wandelera@inspection.gc.ca

Dr Jacques Barrat⁽¹⁾

AFSSA-LERPAS, Laboratoire d'études sur la rage et la pathologie des animaux sauvages
Domaine de Pixérécourt, BP 9, 54220 Malzéville
FRANCE FRANCE FRANCIA
Tel : (33 (0)3) 83.29.89.50 – Fax : (33 (0)3) 83.29.89.58
Email : j.barrat@afssa.fr

Mme Florence Cliquet⁽²⁾

AFSSA-LERPAS, Laboratoire d'études sur la rage et la pathologie des animaux sauvages
Domaine de Pixérécourt, BP 9, 54220 Malzéville
FRANCE FRANCE FRANCIA
Tel : (33 (0)3) 83.29.89.50 – Fax : (33 (0)3) 83.29.89.58
Email : f.cliquet@afssa.fr

Dr Anthony Fooks

Rabies and Wildlife Zoonoses Group, Virology Department, VLA Weybridge
New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1932) 35.78.40 – Fax : (44.1932) 35.72.39
Email : t.fooks@vla.defra.gsi.gov.uk

Rénibactériose – Bacterial kidney disease – Renibacteriosis (*Renibacterium salmoninarum*)

Dr James R. Winton

Western Fisheries Research Center, 6505 N.E. 65th Street, Seattle, Washington 98115
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.206) 526.65.87 – Fax : (1.206) 526.66.54
Email : jim_winton@usgs.gov

Résistance microbienne – Antimicrobial resistance – Resistencia microbiana

Dr Chris Teale

VLA Weybridge
New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44-1734) 46.76.12 – Fax : (44-1734) 44.10.60
Email : c.teale@vla.defra.gsi.gov.uk

Rhinopneumonie équine – Equine rhinopneumonitis – Rinoneumonía equina

Dr George Allen

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 UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.859) 257.47.57 ext. 81119 – Fax : (1.859) 257.85.42
Email : gallen@uky.edu

Dr Jennifer A. Mumford⁽¹⁾

Animal Health Trust
Lanwades Park, Kentford, Newmarket, Suffolk CB8 7UU
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.8700) 50.24.60 – Fax : (44.8700) 50.24.61
Email : jenny.mumford@aht.org.uk

Dr Jennifer A. Mumford⁽²⁾

Cambridge Infectious Diseases Consortium, Department of Veterinary Medicine
Maddingley Road, Cambridge CB3 0ES
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1223) 76.46.66 – Fax : (44.1223) 76.46.67
Email : jam80@hermes.cam.ac.uk

Prof. Konstantin P. Yurov

All-Russian Research Institute for Experimental Veterinary Medicine (VIEV), Head of Virology Department,
Veterinary Department, Ministry of Agriculture and Food
Kuzminki, 109472 Moscow
RUSSIE RUSSIA RUSIA
Tel : (7.095) 995.88.63 – Fax : (7.095) 970.03.69
Email : efzabagina@mtu-net.ru

Rhinotrachéite de la dinde – Turkey rhinotracheitis – Rinotraqueítis del pavo

Dr Nicolas Eterradossi

AFSSA Ploufragan, Unité de virologie, immunologie et parasitologie aviaires et cunicoles
BP 53, 22440 Ploufragan
FRANCE FRANCE FRANCIA
Tel : (33 (0)2) 96.01.62.22 – Fax : (33 (0)2) 96.01.62.63
Email : n.eterradossi@ploufragan.afssa.fr

Rhinotrachéite infectieuse bovine/vulvovaginite pustuleuse infectieuse – Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis – Rinotraqueítis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa

Dr Martin Beer

National Reference Laboratory for Bovine herpesvirus type 1, Institute of Diagnostic Virology, Federal Research
Centre for Virus Diseases of Animals (BFAV)
Boddenblick 5a, 17493 Greifswald - Insel Riems
ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA
Tel : (49) 383.517.223 – Fax : (49) 383.517.275
Email : martin.beer@fli.bund.de

Dr Malcolm Banks

VLA Weybridge
New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1932) 34.11.11 – Fax : (44.1932) 34.70.46
Email : m.banks@vla.defra.gsi.gov.uk

Salmonelloses – Salmonellosis – Salmonelosis

Dr Matthias Hartung

Bundesinstitut für Risikobewertung (Federal Institute for Risk Assessment)
P.O. Box 330013, 14191 Berlin
ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA
Tel : (49.30) 84.12.22.12 – Fax : (49.30) 84.12.29.52
Email : m.hartung@bfr.bund.de

Dr Cornelius Poppe

Laboratory for Foodborne Zoonoses, Guelph Laboratory, Health Canada, Public Health Agency of Canada
110 Stone Road West, Guelph, Ontario, N1G 3W4
CANADA CANADA CANADA
Tel : (1.519) 821.97.02 – Fax : (1.519) 822.22.80
Email : cpoppe@sympatico.ca

Dr Antonia Ricci

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, National Reference Laboratory for Salmonella
Viale Dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)
ITALIE ITALY ITALIA
Tel : (39.049) 808.42.96 – Fax : (39.049) 883.02.68
Email : aricci@izsvenezie.it

Dr Robert H. Davies

VLA Weybridge
New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44-1932) 35.73.61 – Fax : (44-1932) 35.75.95
Email : r.h.davies@vla.defra.gsi.gov.uk

Septicémie hémorragique virale – Viral haemorrhagic septicaemia – Septicemia hemorrágica viral

Dr Niels Jørgen Olesen

National Veterinary Institute, Technical University of Denmark
Hangøvej 2, 8200 Aarhus N
DANEMARK DENMARK DINAMARCA
Tel : (45) 72.34.68.31 – Fax : (45) 72.34.69.01
Email : njo@vet.dtu.dk

Stomatite vésiculeuse – Vesicular stomatitis – Estomatitis vesicular

Dr Ingrid Bergmann

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa OPS/OMS
Av. President Kennedy 7778, Sao Bento, Duque de Caxias, ZC 20054-40 Rio de Janeiro
BRÉSIL BRAZIL BRASIL
Tel : (55.21) 36.61.90.56 – Fax : (55.21) 36.61.90.01
Email : ibergman@panaftosa.ops-oms.org

Dr Sabrina L. Swenson

National Veterinary Services Laboratories, P.O. Box 844, Ames, IA 50010
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.515) 663.75.51 – Fax : (1.515) 663.73.48
Email : sabrina.l.swenson@aphis.usda.gov

Surra – Surra – Surra (*Trypanosoma evansi*)

Dr Filip Claes

Institute of Tropical Medicine Antwerp, Department of Parasitology, Nationalestraat 155, B-2000 Antwerpen
BELGIQUE BELGIUM BELGICA
Tel : (32.3) 247.65.34 – Fax : (32.3) 247.63.73
Email : fclaes@itg.be

Prof. Noboru Inoue

National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine
Inada-cho Nishi 2-13, Obihiro, Hokkaido 080-8555
JAPON JAPAN JAPÓN
Tel : (81.155) 49.56.47 – Fax : (81.155) 49.56.43
Email : protozoa@obihiro.ac.jp

Syndrome de Taura – Taura syndrome – Síndrome de Taura

Prof. Donald V. Lightner

Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona
Building 90, Room 202 Pharmacy/Microbiology, Tucson, AZ 85721
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel : (1.520) 621.84.14 – Fax : (1.520) 621.48.99
Email : dvl@u.arizona.edu

**Syndrome dysgénésique et respiratoire du porc – Porcine reproductive and respiratory syndrome –
Síndrome disgenésico y respiratorio porcino**

Dr Tomasz Stadejek

National Veterinary Research Institute, Department of Swine Diseases
Partyzantow Str. 57, 24-100 Pulawy
POLOGNE POLAND POLONIA
Tel : (48-81) 886.30.51 – Fax : (48-81) 886.25.95
Email : stadejek@piwet.pulawy.pl

Syndrome ulcératif épizootique – Epizootic ulcerative syndrome – Síndrome ulcerante epizootico

Dr Somkiat Kanchanakhan

Inland Aquatic Animal Health Research Institute (AAHRI), Inland Fishery Research and Development Bureau,
Department of Fisheries, Paholyothin Rd, Lardyao, Jatuchak, Bangkok 10900,
THAÏLANDE THAILAND TAILANDIA
Tel : (66.2) 579.41.22 – Fax : (66.2) 561.39.93
Email : kanchanakhan@yahoo.com

Tremblante – Scrapie – Prurigo lumbar

Dr Aru Balachandran

Canadian Food Inspection Agency, Ottawa Laboratory
3851 Fallowfield Road, P.O. Box 11300, Station H, Nepean, Ontario K2H 8P9
CANADA CANADA CANADÁ
Tel : (1.613) 228.66.98 – Fax : (1.613) 228.66.69
Email : balachandrana@inspection.gc.ca

Dr Marion Simmons

VLA Weybridge
New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1932) 35.95.12 – Fax : (44.1932) 35.73.27
Email : TSEucrl@vla.defra.gsi.gov.uk

Prof. Andreas Zurbriggen

Institute of Animal Neurology, University of Bern
Bremgartenstrasse 109A, 3012 Bern
SUISSE SWITZERLAND SUIZA
Tel : (41.31) 631.25.09 – Fax : (41.31) 631.25.38
Email : andreas.zurbriggen@itn.unibe.ch

Trichinellose – Trichinellosis – Triquinelosis

Dr Alvin Gajadhar

Canadian Food Inspection Agency, Centre for Animal Parasitology
116 Veterinary Road, Saskatoon, Saskatchewan S7N 2R3
CANADA CANADA CANADÁ
Tel : (1.306) 975.53.44 – Fax : (1.306) 975.57.11
Email : agajadhar@inspection.gc.ca

Dr Edoardo Pozio

Istituto Superiore di Sanita, Laboratorio di Parasitologia
Viale Regina Elena 299, 00161 Roma
ITALIE ITALY ITALIA
Tel : (39.06) 49.90.23.04 – Fax : (39.06) 49.38.70.65
Email : pozio@iss.it

Trypanosomose (transmise par tsé-tsé) – Trypanosomosis (tsetse-transmitted) – Tripanosomosis (transmitida por tsetse)

Dr Marc Desquesnes

CIRAD-EMVT

Programme Santé animale, TA30/G Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5

FRANCE FRANCE FRANCIA

Tel : (33(0)4) 67.59.37.24 – Fax : (33(0)4) 67.59.37.98

Email : marc.desquesnes@cirad.fr

Tuberculose aviaire – Avian tuberculosis – Tuberculosis aviar

Dr Ivo Pavlik

Veterinary Research Institute

Hudcova 70, 62132 Brno

TCHÈQUE (Rép) CZECH (Rep.) CHECA (Rep.)

Tel : (420.5) 33.33.16.01 – Fax : (420.5) 33.33.12.29

Email : pavlik@vri.cz

Tuberculose bovine – Bovine tuberculosis – Tuberculosis bovina

Dr Amelia Bernardelli

Gerencia de Laboratorios (GELAB) del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad, Agroalimentaria (SENASA)

Av. Alexander Fleming 1653, 1640 Martinez - Pcia de Buenos Aires

ARGENTINE ARGENTINA ARGENTINA

Tel : (54.11) 48.36.00.36 – Fax : (54.11) 48.36.00.36

Email : abernard@senasa.gov.ar ou dilab@inea.com.ar

Dr Debby V. Cousins

Australian Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Agriculture Western Australia

Locked Bag N° 4, Bentley Delivery Centre, Bentley WA 6983

AUSTRALIE AUSTRALIA AUSTRALIA

Tel : (61.8) 93.68.34.51 – Fax : (61.8) 94.74.18.81

Email : dcousins@agric.wa.gov.au

Mme Maria Laura Boschioli-Cara

AFSSA Alfort, Unité Zoonoses Bactériennes, Laboratoire d'études et de recherches en pathologie

animale et zoonoses, 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex

FRANCE FRANCE FRANCIA

Tel : (33 (0)1) 49.77.13.00 – Fax : (33 (0)1) 49.77.13.44

Email : ml.boschioli@afssa.fr

Mr Keith Jahans

VLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB

ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO

Tel : (44.1932) 34.11.11 – Fax : (44.1932) 34.70.46

Email : k.jahans@vla.defra.gsi.gov.uk

Tularémie – Tularemia – Tularemia

Dr Torsten Mörner

National Veterinary Institute, Department of Wildlife

751 89 Uppsala

SUÈDE SWEDEN SUECIA

Tel : (46.18) 67.40.00 – Fax : (46.18) 67.46.90

Email : torsten.morner@sva.se

Virémie printanière de la carpe – Spring viraemia of carp – Viremia primaveral de la carpa

Dr Peter Dixon

The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), Weymouth Laboratory

Barrack Road, The Nothe, Weymouth, Dorset, DT4 8UB

ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO

Tel : (44.1305) 20.66.25 – Fax : (44.1305) 20.66.01

Email : peter.dixon@cefass.co.uk

LISTE DES CENTRES COLLABORATEURS DE L'OIE EN 2008

Diagnostic basé sur la biotechnologie des maladies infectieuses en médecine vétérinaire – Biotechnology-based Diagnosis of Infectious Diseases in Veterinary Medicine – Diagnóstico de las enfermedades infecciosas de la medicina veterinaria basado en la biotecnología

- National Veterinary Institute, 751 89 Uppsala
SUÈDE SWEDEN SUECIA
Tel : (46.18) 67.40.00
Fax : (46.18) 67.46.69
E-mail : sandor.belak@sva.se

Diagnostic des maladies animales et évaluation des vaccins dans les Amériques – Diagnosis of Animal Diseases and Vaccine Evaluation in the Americas – Diagnóstico de las enfermedades animales y evaluación de las vacunas en las Américas

- National Veterinary Services Laboratories⁽¹⁾
USDA, APHIS, Veterinary Services
P.O. Box 844
Ames
Iowa 50010
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Tel : (1.515) 663.72.66
Fax : (1.515) 663.73.97
E-mail : nvsl.concerns@aphis.usda.gov
- Center for Veterinary Biologics⁽²⁾
USDA, APHIS, Veterinary Services
P.O. Box 844, Ames, Iowa 50010
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Tel : (1.515) 663.73.31
Fax : (1.515) 663.76.73
E-mail : cvb@aphis.usda.gov
- Institute for International Cooperation in Animal Biologics⁽³⁾
College of Veterinary Medicine
Iowa State University, Ames, Iowa 50011
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Tel : (1.515) 294.84.59
Fax : (1.515) 294.82.59
E-mail : iicab@iastate.edu
<http://www.cfsph.iastate.edu/iicab/>

Diagnostic des maladies animales par l'ELISA et les techniques moléculaires – ELISA and Molecular Techniques in Animal Disease Diagnosis – Diagnóstico de enfermedades animales por el método ELISA y las técnicas moleculares

- FAO/IAEA Centre for ELISA and Molecular Techniques in Animal Disease Diagnosis
International Atomic Energy Agency,
Wagramerstrasse 5
P.O. Box 100, A-1400 Wien
AUTRICHE AUSTRIA AUSTRIA
Tel : (43.1) 260.02.83.55
Fax : (43.1) 260.02.82.22
E-mail : a.diallo@iaea.org

Diagnostic, épidémiologie et contrôle des maladies animales en régions tropicales – Diagnosis, Epidemiology and Control of Animal Diseases in Tropical Regions – Diagnóstico, epidemiología y control de las enfermedades animales en las regiones tropicales

- CIRAD/EMVT
Campus international de Baillarguet, TA 30/B
Montferrieux-sur-Lez
B.P. 5035
34398 Montpellier Cedex 5
FRANCE FRANCE FRANCIA
Tel : 33 (0)4 67.61.58.01
Fax : 33 (0)4 67.61.55.70
E-mail : emmanuel.camus@cirad.fr

Diagnostic et contrôle des maladies animales en Europe de l'Est, en Asie centrale et en Transcaucasie – Diagnosis and Control of Animal Diseases in Eastern Europe, Central Asia and Transcaucasia – Diagnóstico y control de las enfermedades animales en Europa oriental, Asia central y Transcaucasia

- Federal Governmental Institution, Federal Centre for Animal Health, FGI-ARRIAH
Ministry of Agriculture of the Russian Federation
600901 Yur'evets, Vladimir
RUSSIE RUSSIA RUSIA
Tel : (7.4922) 26.38.77
Fax : (7.4922) 26.19.14
E-mail : mail@arriah.ru
<http://www.arriah.ru> (version russe)
<http://www.arriah.ru/portal/en> (version anglaise)

Épidémiologie, formation et contrôle des maladies aviaires émergentes – Epidemiology, Training and Control of Emerging Avian Diseases – Epidemiología, formación y lucha contra las enfermedades aviares emergentes

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve),
Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padua
ITALIE ITALY ITALIA
Tel.: (39-049) 808.42.79
E-mail : dirsan@izsvenezie.it

Formation des agents des services vétérinaires officiels et pour le diagnostic des maladies animales infectieuses et des zoonoses en Afrique tropicale – Training Veterinary Officials, Diagnosing Infectious Animal Diseases and Zoonoses in Tropical Africa – Formación de veterinarios oficiales, el diagnóstico de epizootias infecciosas y zoonosis en África Tropical

- École Inter-États des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV) de Dakar
SÉNÉGAL SENEGAL SENEGAL
Tel.: (221) 865.10.08
Fax : (221) 825.42.83
E-mail : tekoagbo2001@yahoo.fr

Formation des services vétérinaires – Training of Veterinary Services – Capacitación de los servicios veterinarios

- Centro Buenos Aires para la Capacitación de los Servicios Veterinarios (CEBASEV)
Avenida Alexander Fleming 1653 Piso 1, CP 1640 – Martinez, Pcia de Buenos Aires
ARGENTINE ARGENTINA ARGENTINA
Tel : (54.11) 41.21.53.53
Fax : (54.11) 41.21.53.60
E-mail : asilvest@senasa.gov.ar

Formation des vétérinaires officiels – Training of Official Veterinarians – Formación de Veterinarios Oficiales

- École nationale des Services vétérinaires
1 avenue Bourgelat, BP 83, 69280 Marcy l'Etoile
FRANCE FRANCE FRANCIA
Tel : (33(0)4) 78.87.25.45
Fax : (33(0)4) 78.87.25.48
E-mail : ensv@ensv.vet-lyon.fr

Formation vétérinaire, épidémiologie, sécurité sanitaire des aliments et bien-être animal – Veterinary Training, Epidemiology, Food Safety and Animal Welfare – Entrenamiento Veterinario, Epidemiología, Seguridad Sanitaria de los Alimentos y Bienestar Animal

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale'
Via Campo Boario
64100 Teramo
ITALIE ITALY ITALIA
Tel : (39.0861) 33.22.79
Fax : (39.0861) 33.22.51
E-mail : caporale@izs.it

Information sur les maladies des animaux aquatiques – Information on Aquatic Animal Diseases – Información sobre las enfermedades de los animales acuáticos

- The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Sciences (CEFAS)
Weymouth Laboratory, Barrack Road, The Nothe, Weymouth, Dorset, DT4 8UB
ROYAUME-UNI UNITED KINGDOM REINO UNIDO
Tel : (44.1305) 20.66.26
Fax : (44.1305) 20.66.27
E-mail : b.j.hill@cefasc.co.uk
<http://www.collabcen.net>

Maladies nouvelles et émergentes – New Emerging Diseases – Nuevas enfermedades y enfermedades emergentes

- CSIRO, Australian Animal Health Laboratory (AAHL)
5 Portarlington Road, Private Bag 24, Geelong 3220, Victoria
AUSTRALIE AUSTRALIA AUSTRALIA
Tel : (61.3) 52.27.50.00
Fax : (61.3) 52.27.55.55
E-mail : martyn.jeggo@csiro.au

Médicaments vétérinaires – Veterinary Medicinal Products – Medicamentos veterinarios

- AFSSA Fougères,
Agence nationale du médicament vétérinaire,
B.P. 203, 35302 Fougères Cedex
FRANCE FRANCE FRANCIA
Tel : 33 (0)2 99.94.78.78.71
Fax : 33 (0)2 99.94.78.99
E-mail : p.dehaumont@anmv.afssa.fr
<http://www.anmv.afssa.fr>

Recherche et formation en matière de diagnostic et de systèmes de surveillance des maladies animales – Research and Training in Population Animal Health Diagnosis and Surveillance Systems – Investigación y Formación en el ámbito del Diagnóstico Zoonosario y de los Sistemas de Vigilancia de Poblaciones

- International Epilab, National Veterinary Institute
Technical University of Denmark, Bulowsvej 27, DK-1790 Copenhagen V
DANEMARK DENMARK DINAMARCA
Tel : (45) 72.34.62 43
Fax : (45) 72.34.60 01
E-mail : hvi@dfvf.dk
<http://www.food.dtu.dk>

Recherche sur les maladies aviaires émergentes – Research on Emerging Avian Diseases – Investigación sobre las enfermedades aviares emergentes

- Southeast Poultry and Research Laboratory (SEPRL),
United States Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service
934 College Station Road, Athens, Georgia 30605
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Tel.: (1-706) 546.3433
E-mail : dswayne@sepri.usda.gov

Renforcement des capacités des laboratoires – Laboratory Enhancement (Capacity Building) – Desarrollo de capacidad de los laboratorios

- Australian Animal Health Laboratory (AAHL), Geelong,
AUSTRALIE AUSTRALIA AUSTRALIA
Tel : (61.3) 52.27.50.14
Fax : (61.3) 52.27.52.50
E-mail : peter.daniels@csiro.au

Renforcement des capacités des services vétérinaires – Veterinary Services Capacity Building –Desarrollo de capacidad de los servicios veterinarios

- Center for Animal Health and Food Safety (CAHFS), University of Minnesota, 136 Andrew Boss Laboratory, St. Paul, MN 55108,
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Tel : (1-612) 625-8709
Fax : (1-612) 624-4906
E-mail : cahfs@umn.edu
Web site: <http://www.cahfs.umn.edu>

Science du bien-être animal et de l'analyse bioéthique (Asie/Pacifique) – Animal Welfare Science and Bioethical Analysis (Asia/Pacific) – Ciencias relativas al bienestar animal y el análisis bioético (Asia/Pacífico)

- Animal Welfare Science and Bioethics Centre (AWSBC)
Universidad de Massey, Private Bag 11 222, Palmerston North,
NOUVELLE-ZÉLANDE NEW ZEALAND NUEVA ZELANDA
Tel.: (+6) 350.48.07
E-mail : d.j.mellor@massey.ac.nz

Sécurité sanitaire des aliments, diagnostic et contrôle des maladies animales en Europe de l'Est, en Asie centrale et en Transcaucasie – Food Safety, Diagnosis and Control of Animal Diseases in Eastern Europe, Central Asia and Transcaucasia – Seguridad sanitaria de los Alimentos y el Diagnóstico y Control de las Enfermedades Animales en Europa oriental, Asia central y Transcaucasia

- All-Russian Research Institute for Control
Standardisation and Certification of Veterinary Preparations
Ministry of Agriculture and Food
5 Zvenigorodskoye shosse,
123022 Moscou
RUSSIE RUSSIA RUSSIA
Tel : (7.095) 253.14.91
Fax : (7.095) 253.14.91
E-mail : Vgnki-vet@mtu-net.ru

Surveillance et contrôle des maladies animales en Afrique – Surveillance and Control of Animal Diseases in Africa – Vigilancia y control de enfermedades animales en África

- Onderstepoort Veterinary Institute
Agricultural Research Council
Private Bag X05
Onderstepoort 0110
AFRIQUE DE SUD SOUTH AFRICA SUDÁFRICA
Tel : (27.12) 529.91.06
Fax : (27.12) 565.46.64
E-mail : musoket@arc.agric.za

Surveillance et contrôle des maladies animales protozoaire – Surveillance and Control of Animal Protozoan Diseases – Vigilancia y el control de las enfermedades protozoicas animales

- National Research Center for Protozoan Diseases
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine
JAPON JAPAN JAPÓN
Tel : (81-155) 49-5641
Fax : (81-155) 49-56430
E-mail : igarcpmi@obihiro.ac.jp

Surveillance et suivi, épidémiologie et gestion des maladies des animaux sauvages – Wildlife Disease Surveillance and Monitoring, Epidemiology and Management – Vigilancia y el seguimiento, epidemiología y gestión de las enfermedades de la fauna salvaje

- Canadian Cooperative Wildlife Health Centre (CCWHC),
Department of Veterinary Pathology, Western College of Veterinary Medicine,
University of Saskatchewan,
52 Campus Drive, Saskatoon S7N 5B4
CANADA CANADÁ CANADÁ
Tel.: (+1-800) 567.20.33
E-mail : ccwhc@usask.ca

Systèmes de surveillance des maladies animales et analyse des risques – Animal Disease Surveillance Systems and Risk Analysis – Sistemas de vigilancia de enfermedades animales y análisis de riesgos

- Centers for Epidemiology and Animal Health
USDA-APHIS-VS-CEAH
2150 Centre Avenue, Building B
Fort Collins, Colorado 80526-8117
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Tel : (1.970) 494.70.01
Fax : (1.970) 472.26.68
E-mail : cristobal.zepeda@aphis.usda.gov
<http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/ceahpage.htm>

Validation, assurance qualité et contrôle qualité des épreuves diagnostiques et des vaccins contre les maladies vésiculeuses en Europe – Validation, Quality Assessment and Quality Control of Diagnostic Assays and Vaccine Testing for Vesicular Diseases in Europe – Validación, aseguramiento y control de la calidad de los ensayos de diagnóstico y las pruebas de vacunas para enfermedades vesiculares en Europa¹³

- Centre d'Etudes et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques (CERVA) de Ukkel
BELGIQUE BELGIUM BÉLGICA
Tel.: (32-2) 379.04.00
Fax : (32-2) 379.06.66
E-mail : kris.de.clercq@var.fgov.be

Zoonoses émergentes et ré-émergentes – Emerging and Re-emerging Zoonotic Diseases – Enfermedades Zoonóticas Emergentes y Re-emergentes

- National Center for Infectious Diseases, CDC, Division of Bacterial and Mycotic Diseases
1600 Clifton Road, Mailstop C12, Room 6034, Building 1, Atlanta, Georgia 30333
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE UNITED STATES OF AMERICA ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Tel : (1-404) 639.38.31
Fax : (1-404) 639.44.41
E-mail : nmarano@cdc.gov

Zoonoses en Europe – Zoonoses in Europe – Zoonosis en Europa

- Friedrich-Loeffler-Institute, Boddenblick 5a, 17493 Greifswald, Insel Riems
ALLEMAGNE GERMANY ALEMANIA
Tel : (49-38351) 7-102
Fax : (49-38351) 7-151
E-mail : thomas.mettenleiter@fli.bund.de

Zoonoses parasitaires d'origine alimentaire – Food-Borne Zoonotic Parasites – Zoonosis parasitarias de origen alimentario

- Canadian Food Inspection Agency
Centre for Animal Parasitology
116 Veterinary Road
Saskatoon, Saskatchewan S7N 2R3
CANADA CANADA CANADÁ
Tel : (1.306) 975.53.44
Fax : (1.306) 975.57.11
E-mail : agajadhar@inspection.gc.ca

*
* *

LISTE PAR ORDRE ALPHABÉTIQUE DES MALADIES MENTIONNÉES DANS CE MANUEL TERRESTRE

Maladie	Page
A carapiose des abeilles mellifères.....	426
Adénomatose pulmonaire ovine (adénocarcinome)	1128
<i>Aethina tumida</i> (voir Infestation par le petit coléoptère des ruches)	
Agalaxie contagieuse.....	1086
Akabane (voir Maladies animales à Bunyavirus [Fièvre de la Vallée du Rift non comprise])	
Anaplasmose bovine.....	655
Anémie infectieuse des équidés.....	949
Anthrax (voir fièvre charbonneuse)	
Artérite virale équine.....	990
Arthrite/encéphalite caprine et Maedi-visna.....	1076
Aujeszky (voir Maladie d'Aujeszky)	
Avortement enzootique des brebis	1109
B abésiose bovine.....	667
Bluetongue (voir Fièvre catarrhale du mouton)	
Border disease (voir Maladie de la frontière)	
Bronchite infectieuse aviaire.....	482
<i>Brucella ovis</i> (voir Épididymite contagieuse ovine)	
Brucellose (voir Brucellose bovine, Brucellose ovine et caprine [Infection à <i>Brucella ovis</i> exclue], Épididymite contagieuse ovine [<i>Brucella ovis</i>], ou Brucellose porcine)	
Brucellose bovine.....	681
Brucellose ovine et caprine (Infection à <i>Brucella ovis</i> exclue).....	1066
Brucellose porcine (<i>Brucella suis</i>).....	1213
Bursite infectieuse (Maladie de Gumboro).....	599
C ache (voir Maladies animales à Bunyavirus [Fièvre de la Vallée du Rift non comprise])	
Campylobactériose génitale bovine.....	721
<i>Campylobacter coli</i>	1299
<i>Campylobacter fetus</i> (voir Campylobactériose génitale bovine)	
<i>Campylobacter jejuni</i>	1299

Maladie	Page
Chlamydiose aviaire.....	469
Chlamydiose ovine (voir Avortement enzootique des brebis)	
Choléra aviaire (Pasteurellose aviaire).....	571
<i>Chrysomya bezziana</i> (voir Myiase)	
Clavelée et variole caprine.....	1157
<i>Cochliomyia hominivorax</i> (voir Myiase)	
Coryza gangréneux.....	850
Cowdriose.....	238
Cryptosporidioses.....	1307
Cysticercoses.....	1332
Cysticercose bovine.....	720
Cysticercose porcine.....	1221
D ermatophilose.....	791
Dermatose nodulaire contagieuse.....	838
Diarrhée virale bovine.....	761
Dourine.....	925
E chinococcose/Hydatidose.....	191
Encéphalite due au virus Nipah.....	1212
Encéphalite japonaise.....	253
Encéphalomyélite à Teschovirus (anciennement encéphalomyélite à entérovirus ou maladie de Teshen/Talfan).....	1256
Encéphalomyélite équine (de l'Est et de l'Ouest).....	940
Encéphalomyélite équine vénézuélienne.....	1019
Encéphalopathie spongiforme bovine.....	732
Entérite virale du canard (voir Peste du canard)	
Épididymite contagieuse ovine.....	1118
<i>Escherichia coli</i> vérocytotoxinogène.....	1417
F ièvre aphteuse.....	207
Fièvre catarrhale du mouton.....	172
Fièvre charbonneuse.....	147
Fièvre de la Vallée du Rift.....	353
Fièvre de West Nile.....	414

Maladie	Page	Maladie	Page
Fièvre Q.....	319	Maladie hémorragique du lapin.....	1036
G ales.....	1374	Maladie vésiculeuse du porc.....	1248
Gale équine.....	1017	Metapneumovirus aviaires (voir Rhinotrachéite infectieuse de la dinde [metapneumovirus aviaire])	
Gastro-entérite transmissible.....	1264	Métrite contagieuse équine.....	917
Grippe équine.....	954	Morve.....	1006
Grippe porcine.....	1236	Myiase (Myiase à <i>Cochliomyia hominivorax</i> et Myiase à <i>Chrysomya bezziana</i> connues également comme Myiase du Nouveau Monde et Myiase de l'Ancien Monde).....	290
H earthwater (voir Cowdriose)		<i>Mycoplasma gallisepticum</i> (voir Mycoplasmosse aviaire)	
Hendra (voir Maladies dues aux virus Hendra et Nipah)		<i>Mycoplasma synoviae</i> (voir Mycoplasmosse aviaire)	
Hépatite virale du canard.....	561	Mycoplasmosse aviaire (<i>Mycoplasma gallisepticum</i> , <i>M. synoviae</i>).....	525
Hog cholera (voir Peste porcine classique)		Myxomatose.....	1025
Hydatidose (voir Echinococcose/hydatidose)			
I nfection à <i>Trypanosoma evansi</i> (y compris le Surra).....	386	N ewcastle (voir Maladie de Newcastle)	
Infestation des abeilles mellifères par <i>Tropilaelaps</i> (<i>Tropilaelaps</i> spp.).....	458	Nipah (voir Maladies dues aux virus Hendra et Nipah)	
Infestation par le petit coléoptère des ruches (<i>Aethina tumida</i>)	454	Nosémose des abeilles mellifères.....	448
Influenza aviaire.....	506		
L aryngotrachéite infectieuse aviaire.....	496	P aratuberculose (Maladie de Johne).....	302
Leishmaniose.....	263	Pasteurellose aviaire (voir Choléra aviaire)	
Leptospirose.....	275	Péripneumonie contagieuse bovine.....	777
Leucose bovine enzootique.....	795	Peste aviaire (voir Influenza aviaire)	
<i>Listeria monocytogenes</i>	1356	Peste bovine.....	365
Loque américaine des abeilles mellifères.....	433	Peste des petits ruminants.....	1133
Loque européenne des abeilles mellifères.....	443	Peste du canard.....	553
Lymphangite épizootique.....	933	Peste équine.....	901
M aladies animales à Bunyavirus (Fièvre de la Vallée du Rift non comprise).....	1277	Peste porcine africaine.....	1169
Maladie d'Aujeszky.....	157	Peste porcine classique.....	1195
Maladie de Gumboro (voir Bursite infectieuse)		Piroplasmoses équines.....	969
Maladie de Johne (voir Paratuberculose)		Pleuropneumonie contagieuse caprine.....	1095
Maladie de la frontière.....	1053	Pseudorage (voir Maladie d'Aujeszky)	
Maladie de Marek.....	618	Pullorose (voir Typhose et Pullorose)	
Maladie de Newcastle.....	629		
Maladie de Teschen/Talfan (voir Encéphalomyélite à Teschovirus)		R age.....	333
Maladies dues aux virus Hendra et Nipah.....	1344	Rhinite atrophique du porc.....	1185
Maladie du mouton de Nairobi.....	1117	Rhinopneumonie équine.....	979
		Rhinotrachéite infectieuse bovine/vulvovaginite pustuleuse infectieuse.....	821
		Rhinotrachéite infectieuse de la dinde (metapneumovirus aviaires)	645

Maladie	Page	Maladie	Page
Salmonella abortusovis.....	1145	Trypanosomoses	
Salmonelloses.....	1387	(transmises par les tsé-tsé).....	889
Sépticémie hémorragique.....	806	Tuberculose aviaire.....	542
Stomatite vésiculeuse.....	403	Tuberculose bovine.....	745
Surra (voir Infections à <i>Trypanosoma evansi</i> [y compris le Surra])		Tularémie.....	396
Syndrome dysgénésique et respiratoire du porc.....	1222	Typhose et Pullorose.....	587
Theilériose	862	Varroose des abeilles mellifères.....	463
Toxoplasmose.....	1406	Variole aviaire.....	579
Tremblante.....	1146	Variole caprine	
Trichinellose.....	376	(voir Clavelée et variole caprine)	
Trichomonose.....	880	Variole des camélidés.....	1290
<i>Tropilaelaps clareae</i> (voir Infestation des abeilles mellifères par <i>Tropilaelaps</i>)		Variole équine.....	1018
<i>Tropilaelaps koenigerum</i> (voir Infestation des abeilles mellifères par <i>Tropilaelaps</i>)		Vulvovaginite pustuleuse infectieuse (voir Rhinotrachéite infectieuse bovine/vulvovaginite pustuleuse infectieuse)	
<i>Trypanosoma equiperdum</i> (voir Dourine)		West Nile (voir Fièvre de West Nile)	
<i>Trypanosoma evansi</i> (voir Infections à <i>Trypanosoma evansi</i> [y compris le Surra])		Zoonoses transmissibles depuis les primates autres que l'homme.....	1430