

SECTION 2.1.

MALADIES DE LA LISTE A

CHAPITRE 2.1.1.

FIÈVRE APHTEUSE

RÉSUMÉ

La fièvre aphteuse (FA) est la plus contagieuse des maladies des mammifères. Elle a un grand potentiel de nuisances parce qu'elle peut causer de sévères pertes économiques dans les espèces artiodactyles (à sabots fendus). Il y a 7 sérotypes de virus de la FA qui sont appelés O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3 et Asia 1. L'infection avec un sérotype ne confère pas de protection contre les autres sérotypes. Cliniquement, la FA ne peut pas être différenciée des autres maladies vésiculaires que sont la maladie vésiculeuse porcine (MVP), la stomatite vésiculeuse (SV) et l'exanthème vésiculeux (EV). En conséquence le diagnostic de laboratoire prend toute son importance en cas de découverte ou de suspicion de foyer.

*Les cas typiques de FA sont caractérisés par l'apparition de vésicules de la peau entre et autour des sabots, des muqueuses linguale et buccale et chez les femelles de la peau des mamelles. Ces vésicules en se rompant créent des lésions appelées « aphtes ». Les signes cliniques peuvent varier grandement de la forme atténuée à la forme très sévère qui peut entraîner la mort, surtout chez les jeunes animaux. Dans certaines espèces sauvages, l'infection peut rester sub-clinique, par exemple chez le buffle africain (*Syncerus caffer*). Le tissu à privilégier pour le diagnostic est l'épithélium des vésicules non rupturées ou fraîchement rupturées ou encore le liquide vésiculaire lui-même. Quand cela n'est pas possible, le sang et/ou le fluide oesophago-pharyngé prélevé par l'épreuve de la curette pharyngienne chez les ruminants ou par écouvillonnage pharyngé chez le porc sont de bonne source de remplacement pour les prélèvements de virus FA. Des prélèvements de myocarde ou de sang peuvent être faits dans les cas mortels, mais les vésicules sont toujours à privilégier si elles sont présentes.*

Il est très important que les prélèvements provenant des cas suspects soient transportés dans des conditions de sécurité adéquates en respectant les réglementations internationales. Le laboratoire de destination doit toujours être un laboratoire autorisé pour manipuler le virus FA.

Le diagnostic du virus FA est fait par isolement du virus ou par démonstration de la présence d'antigènes ou d'acide nucléique du virus FA dans les tissus ou les fluides. La détection des anticorps spécifiques circulants peut aussi être utilisée pour le diagnostic. Le sérodiagnostic est amélioré par les épreuves récemment apparues comme les épreuves pour les protéines virales non structurales (PNS) qui peuvent détecter les infections passées ou présentes quel que soit le statut vaccinal de l'animal prélevé.

Identification de l'agent pathogène : *la démonstration de la présence d'antigènes viraux est suffisante pour poser un diagnostic positif. En raison de la nature très contagieuse de la FA et de son importance économique, il est essentiel que le diagnostic de laboratoire du virus responsable soit établi par un laboratoire qui réponde aux normes de confinement de l'OIE pour les agents pathogènes de type 4.*

La fixation du complément (FC) a été remplacée dans beaucoup de laboratoires par la réaction immuno-enzymatique (ELISA) jugée plus spécifique et plus sensible et non perturbée par les composés pro ou anti-complémentaires. Si le prélèvement n'est pas adéquat ou si l'épreuve n'est pas concluante, il est nécessaire de cultiver le virus en culture cellulaire ou sur souriceaux de moins de 7 jours. La culture cellulaire devrait utiliser de préférence des cellules primaires de thyroïde de

bovins, mais les cellules de reins d'agneau, de veau ou de porc ainsi que des cellules de lignée de sensibilité comparable conviennent parfaitement. Quand l'effet cytopathogène (ECP) est largement observé dans le tapis cellulaire, les surnageants de culture peuvent être testés par FC ou par ELISA. Les mêmes épreuves peuvent être exécutées avec des suspensions homogénéisées de tissus de muscles disséqués de souriceaux morts après inoculation.

Les épreuves de reconnaissance de l'acide nucléique viral comme la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sont utilisées de plus en plus comme méthodes rapides et sensibles de diagnostic. L'examen en microscopie électronique de fragments de lésions peut aussi être utile pour différencier la FA de maladies causées par d'autres virus.

Épreuves sérologiques : la démonstration de la présence d'anticorps spécifiques contre les protéines virales structurelles chez des animaux non vaccinés quand il y a présence d'aphtes, est suffisant pour porter un diagnostic positif. Ceci est particulièrement utile dans les formes atténuées de la maladie ou quand il n'y a pas d'épithélium à prélever. Les épreuves pour les anticorps anti-protéines virales non structurelles (PNS) sont utiles pour rechercher la confirmation de répliquions virales ancienne ou actuelle quel que soit le statut vaccinal de l'hôte. Les PNS, à l'inverse des protéines structurelles, ne sont pas spécifiques de sérotype et la détection des anticorps dirigés contre elles n'aide pas à l'identification du sérotype de l'agent causal.

La séroneutralisation ou neutralisation virale (SN) et le test ELISA pour anticorps dirigés contre les protéines structurelles sont utilisés pour les diagnostics spécifiques. Les méthodes de SN sont dépendantes des cultures de cellules contrairement à l'ELISA, elles demandent aussi plus de temps et sont perturbées par les contaminations. La méthode ELISA est plus rapide et comme elle peut utiliser des antigènes inactivés elle permet de travailler en confinement biologique moins contraignant.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : les vaccins à virus inactivés de diverses compositions sont disponibles sur le marché international. Généralement de tels vaccins sont obtenus en cultivant du virus sur culture cellulaire en mono-couche ou en suspension. En fin de culture virale, la préparation est clarifiée, inactivée avec de l'éthylènimine et traitée et concentrée avant d'être mélangée à des adjuvants de l'immunité. La plupart des vaccins de la FA sont multivalents pour conférer une protection contre plusieurs sérotypes prévalant dans certaines régions.

Le vaccin fini doit être libre de virus résiduel virulent. Ceci est démontré par des tests in vitro utilisant les concentrés de virus inactivés avant la formulation du vaccin. Ces tests sont aussi confirmés par des essais in vivo ou in vitro pratiqués avec le vaccin commercial. Des tests avec épreuve virulente sont aussi réalisés sur bovins vaccinés pour établir la dose protectrice 50 % (DP₅₀) ou protection contre la généralisation podale (PGP), bien qu'une épreuve sérologique puisse être considérée comme suffisante quand une corrélation validée entre protection et niveau en anticorps spécifiques a été établie.

Les établissements fabricant les vaccins de la FA doivent également satisfaire aux exigences de l'OIE pour le confinement biologique des agents pathogènes de type 4.

Les réactifs de référence et de diagnostic sont disponibles auprès des Laboratoires de référence de l'OIE pour la FA ou au Laboratoire mondial de référence (LMR) pour la FA de la FAO¹ (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) qui est situé à Pirbright. En matière de FA, le laboratoire de Pirbright est à la fois LMR et Laboratoire de référence de l'OIE (voir note de bas de page n°1).

A. INTRODUCTION

La fièvre aphteuse (FA) est causée par un virus du genre *Aphtovirus*, famille des *Picornaviridae*. Il existe 7 sérotypes nommés O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3, et Asia 1, qui infectent les animaux à onglons. L'infection par un sérotype n'induit pas d'immunité contre un autre sérotype. À l'intérieur d'un sérotype de nombreux sous-types ont été identifiés par des méthodes biochimiques et immunologiques.

1 Laboratoire mondial de référence (LMR) de la FAO pour la FA, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, Royaume-Uni.

En Afrique, les virus FA maintiennent leur présence chez les bovins et les buffles africains (*Syncerus caffer*) qui en sont les hôtes les plus usuels. Il existe des preuves scientifiques que les autres espèces domestiques ou sauvages puissent être infectées, mais sans maintenir l'infection plus de quelques mois en l'absence de bovins ou de buffles africains. Ailleurs dans le monde, les bovins sont habituellement le réservoir principal, bien que parfois les virus en cause puissent apparaître très spécifiquement adaptés aux porcs domestiques ou aux moutons et chèvres. Il est probable que ces virus adaptés sont capables de modifier leur adaptation pour affecter d'autres espèces s'ils en ont l'opportunité. Cependant la souche FA adaptée au porc, dite Cathay n'a pas infecté de manière apparente les grands ruminants sur le terrain ou expérimentalement, et a requis l'emploi de cellules primaires porcines pour sa multiplication. La faune animale en dehors d'Afrique, n'a pas montré jusqu'à maintenant sa capacité à maintenir l'infection par les virus FA. Il a été prouvé que l'infection des chevreuils dans le passé était toujours dérivée de contacts, directs ou indirects avec des animaux domestiques.

Parmi les espèces domestiques, les bovins, porcins, moutons et chèvres ainsi que les buffles d'eau sont sensibles à la FA (23). De plus, beaucoup d'espèces sauvages à onglons, comme les cervidés, les antilopes et les divers porcins sauvages peuvent être infectés, mais leur responsabilité dans l'épidémiologie de la FA chez les espèces domestiques n'est pas avérée, contrairement à celle des buffles africains. Des souches de virus FA qui infectaient des bovins ont été isolées aussi de sangliers et de cervidés. Pour le diagnostic de la FA chez les espèces sauvages, les procédures sont les mêmes que celles décrites pour les animaux d'élevage.

L'infection des animaux sensibles par le virus FA se traduit par l'apparition de vésicules sur la peau entourant les onglons, dans et autour de la cavité buccale et sur les glandes mammaires des femelles. Les vésicules peuvent aussi apparaître à d'autres endroits comme dans les narines et sur les points d'appui des pattes, surtout chez les porcs. La sévérité des signes cliniques varie selon les souches virales, la dose infectante, l'âge et la race des animaux ainsi que leur degré d'immunité (35). Les signes peuvent varier depuis l'infection inapparente ou atténuée jusqu'à l'infection sévère. La mort peut survenir dans certains cas. La mortalité par myocardite multifocale est le plus souvent observée chez les jeunes animaux ; une myosite peut aussi survenir à d'autres endroits.

Dans les établissements avec un historique de mort subite de jeune bétail à onglons, un examen attentif des animaux adultes peut révéler souvent la présence de lésions de vésicules si la FA est en cause. La présence de vésicules est variable dans les cas léthaux.

Chez les animaux avec un historique de maladie vésiculeuse, la détection du virus FA dans les prélèvements de lymphes vésiculaires, de tissus épithéliaux, de prélèvement oesophago-pharyngé (probang), de lait ou de sang est suffisante pour établir un diagnostic. Le diagnostic peut aussi être établi par l'isolement du virus FA du sang, du cœur ou d'autres organes dans les cas léthaux. Une myocardite peut être observée macroscopiquement dans une grande proportion des cas léthaux.

Le virus FA peut se répliquer et peut être excrété par l'appareil respiratoire des animaux. L'excrétion aérienne du virus se produit durant la phase aiguë de l'infection. Les virus FA peuvent être observés dans toutes les sécrétions et excréments, y compris dans l'air expiré des animaux infectés en phase aiguë. La transmission est généralement effectuée par contact entre animaux sensibles, d'infectés à sains ou plus rarement par l'exposition des sujets sensibles aux excréments et sécrétions des animaux infectés en phase aiguë. Après guérison, le virus infectieux disparaît de toutes les sécrétions et excréments à l'exception notable des sécrétions oesophago-pharyngées de quelques ruminants, dans lesquelles le virus vivant va continuer à être présent. Les animaux chez lesquels le virus persiste dans le liquide oesophago-pharyngé pendant plus de 28 jours après infection sont appelés porteurs de virus. Les porcs ne deviennent jamais porteurs de virus. Des concours de circonstances ont indiqué que les porteurs de virus et particulièrement les buffles africains, sont capables de transmettre, en de rares occasions, l'infection à des animaux sensibles venus à leur contact : le mécanisme en cause est inconnu. L'état de porteur viral ne persiste pas plus de 6 mois chez les bovins, bien que dans une faible proportion, cet état puisse durer jusqu'à 3 ans. Chez les buffles africains, des individus ont été observés comme porteurs viraux pendant 5 ans, mais cela ne doit probablement pas durer toute une vie. Dans un troupeau de buffles africains, le virus peut persister pendant 24 ans ou plus. Il n'existe pas d'information sur la durée du portage chez le buffle d'Asie. En règle générale, les buffles d'Asie, les moutons et chèvres ne portent pas le virus FA plus de quelques mois.

Du fait du caractère hautement contagieux et de l'importance économique de la fièvre aphteuse, le diagnostic et l'identification des sous-types du virus doivent être effectués dans des installations qui répondent aux exigences pour le confinement des agents pathogènes du groupe 4, telles qu'elles sont exposées dans l'annexe I.1.6.1. du Chapitre 1.1.6., « La biosécurité au laboratoire de microbiologie vétérinaire », de ce *Manuel terrestre*. Les pays qui n'ont pas de telles installations spécialisées nationales ou régionales doivent envoyer les échantillons à un Laboratoire de référence de l'OIE pour la fièvre aphteuse. Les installations de production de vaccins de la fièvre aphteuse doivent également satisfaire aux exigences pour le confinement des agents pathogènes du groupe 4 de l'OIE.

Les réactifs de diagnostic sont disponibles sous forme individuelle ou sous forme de trousse de diagnostic auprès des Laboratoires de référence de l'OIE pour la FA. L'emploi d'antigènes inactivés dans la méthode immuno-enzymatique (ELISA) soit comme témoins dans l'épreuve de détection des virus de terrain, soit pour réagir avec les sérums du terrain dans les tests ELISA de blocage compétitif en phase liquide ou solide, réduit encore le risque lié à l'utilisation de virus vivants. Les réactifs sont délivrés sous forme lyophilisée ou liquide en glycérol et restent stables à 4°C ou plusieurs années à -20°C.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

Pour le diagnostic de laboratoire, le tissu de choix est l'épithélium ou le liquide vésiculaire. Idéalement, au moins un gramme de tissu épithélial doit être collecté sur un vésicule non rompue ou récemment rompue. Pour des raisons de bien-être animal et aussi pour éviter les blessures aux personnes en charge de la collecte des prélèvements, il est recommandé d'administrer des sédatifs aux animaux avant tout type de prélèvement.

Les fragments d'épithélium doivent être placés dans un tampon de transport composé à parts égales de glycérol et d'une solution tamponnée au phosphate 0,04 M, pH 7,2 à 7,6, avec de préférence des antibiotiques (pénicilline-1 000 unités internationales (UI), sulfate de néomycine-100 UI, sulfate de polymyxine B-50 UI, mycostatine-100 UI). Si la solution tamponnée au phosphate 0,04 M n'est pas disponible, du milieu de culture cellulaire ou une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) pourront être utilisés à condition que le pH du mélange avec le glycérol soit compris entre 7,2 et 7,6. Le virus FA est extrêmement labile à des pH bas et le bon tamponnement du milieu de transport est le point critique pour la réussite de la collecte d'échantillon. Les échantillons doivent être gardés réfrigérés ou sur la glace jusqu'à réception au laboratoire.

Quand le tissu épithélial n'est pas présent chez les ruminants, par exemple chez les animaux convalescents ou quand l'infection est suspectée en absence de signes cliniques, des échantillons de fluide oesophago-pharyngé peuvent être collectés avec une curette probang (sputum), ou chez les porcs par écouvillonnage de la gorge. Ces échantillons seront soumis pour isolement viral à un laboratoire.

Avant de prélever les liquides oesophago-pharyngés chez les bovins ou autres grands ruminants (ex. buffles), mettre dans un flacon d'une capacité de 5 ml, 2 ml de liquide de transport composé de 0,08 M tampon phosphate contenant 0,01 % d'albumine bovine, 0,002 % de rouge de phénol ainsi que des antibiotiques (1 000 unités/ml de pénicilline, 100 unités/ml de mycostatine, 100 unités/ml de néomycine et 50 unités/ml de polymyxine) le tout ajusté à pH 7,2. Le flacon retenu doit résister à la congélation en présence de glace carbonique (glace sèche) ou après immersion dans l'azote liquide (29).

Après collecte du liquide oesophago-pharyngé avec une curette probang, le contenu de la curette doit être vidé dans un flacon transparent à large col d'une capacité d'environ 20 ml. Le fluide recueilli est examiné et doit contenir quelques fragments visibles de tissus. Ensuite 2 ml contenant des fragments de tissus sont prélevés et ajoutés au 2 ml du liquide de transport. L'ensemble est agité doucement et le pH est vérifié (autour de 7,6). Les prélèvements contaminés par du contenu de rumen seront rejetés comme impropres aux cultures virales. Répéter le prélèvement après rinçage de la bouche et de la gorge de l'animal avec de l'eau ou du tampon phosphate.

Les prélèvements oesophago-pharyngés de petits ruminants sont collectés de la même manière, mais on ajoute au faible contenu de la curette les 2 ml de liquide de transport préalablement mis dans le flacon de 20 ml à large col. Après agitation, le mélange est transféré dans le flacon de transport résistant à la congélation comme décrit ci-dessus.

Les prélèvements oesophago-pharyngés doivent être réfrigérés ou mieux congelés immédiatement après collecte. Si l'on doit les garder en transit pour plus de quelques heures, il vaut mieux les congeler en les plaçant sur de la glace carbonique ou dans de l'azote liquide. Avant d'être congelés les flacons doivent être fermés avec précaution en utilisant des bouchons à vis étanches à l'air ou du silicone. Ceci est particulièrement important quand de la glace carbonique est utilisée comme réfrigérant, le CO₂ pouvant faire baisser le pH s'il pénètre dans le flacon contenant le prélèvement. Les flacons de verre ne doivent pas être utilisés s'ils présentent le risque d'exploser à la décongélation après que de l'azote liquide ait pénétré à l'intérieur. Les prélèvements doivent arriver au laboratoire sous forme congelée ou, si c'est impossible, sous forme réfrigérée.

Des précautions spéciales sont requises pour expédier du matériel biologique suspecté de contamination aphteuse, à la fois à l'intérieur d'un pays ou entre pays. L'Association Internationale des Transporteurs Aériens (IATA pour *International Air Transport Association*) a des exigences très explicites pour l'emballage et l'envoi des

prélèvements pour diagnostic par tous moyens commerciaux de transports (Règlement pour les Matières Dangereuses). Ceci est résumé au Chapitre 1.1.1., « Méthodes de prélèvement ».

1. Identification de l'agent pathogène

a) Isolement viral

Les prélèvements épithéliaux doivent être prélevés dans le tampon glyciné de transport, puis séchés sur du papier absorbant pour éliminer le glycérol toxique pour les cultures cellulaires, puis pesé. Une suspension est préparée par broyage du prélèvement dans du sable stérile avec un pilon et un mortier stériles en présence d'un petit volume de milieu de culture cellulaire avec antibiotiques. Ensuite du milieu de culture devra être ajouté jusqu'à obtention d'un volume final égal à 5 fois la quantité initiale utilisée avec le prélèvement (suspension finale à 20 %). Le tout est clarifié par centrifugation à 2 000 **g** pendant 10 min. Après clarification, les suspensions suspectées de contamination virale aphteuse sont inoculées dans des cultures cellulaires ou à des souriceaux nouveau-nés. Les systèmes de cultures cellulaires sensibles incluent les cellules primaires de thyroïde bovine, les cellules primaires de porc, veau ou agneau. Des lignées de cellules comme BHK-21 (Baby Hamster Kidney) et IB-RS-2 peuvent aussi être utilisées (12). La sensibilité de toute cellule utilisée pour l'isolement du virus devrait être testée en utilisant des préparations de virus FA standardisées. Les cultures cellulaires doivent être examinées pendant 48 h pour rechercher un effet cytopathogène (ECP). Si aucun ECP n'est détecté, les cellules sont congelées puis décongelées et utilisées pour inoculer une culture cellulaire fraîche pour une observation supplémentaire de 48 h à la recherche d'ECP. Les souriceaux nouveau-nés sont une alternative aux cultures cellulaires. Ils doivent être agés de 2 à 7 jours et de souches consanguines. Certains virus du terrain nécessitent plusieurs passages avant de s'adapter aux souriceaux (41). Dans le cas des liquides oesophago-pharyngés, un prétraitement avec un volume égal de chloro-fluoro-carbones augmente habituellement le niveau de détection virale en désagréant les complexes anticorps-virus.

b) Méthodes immunologiques

- Méthode immuno-enzymatique

La méthode habituelle de détection des antigènes viraux aphteux et d'identification des sérotypes viraux est la méthode ELISA (22, 39). C'est une épreuve sandwich indirecte dans lequel un anti-sérum de lapin dirigé contre les 7 sérotypes aphteux est adsorbé dans des cupules de différentes rangées d'une microplaque appropriée. C'est le sérum de capture des virus. Les suspensions de prélèvements du terrain sont ajoutées à chacune des rangées et des témoins sérologiques appropriés sont inclus. Un sérum hyperimmun de cobaye spécifique pour chacun des types viraux FA est ensuite ajouté suivi par un sérum de lapin anti-sérum de cobaye conjugué à une enzyme. Des lavages abondants sont pratiqués entre chacune de ces opérations pour enlever les réactifs non fixés. Une réaction colorée indique une réaction sérologique positive grâce à l'addition du substrat de l'enzyme. Une réaction fortement positive est évidente à lire à l'œil nu, mais peut aussi se lire au spectrophotomètre à une longueur d'onde appropriée. Dans ce cas, un résultat d'absorbance supérieur de 0,1 au dessus du bruit de fond indique une réaction positive indicatrice du sérotype impliqué. Les valeurs proches de 0,1 doivent être reconfirmées par une seconde épreuve ou par multiplication du virus sur cellules et épreuve sur le surnageant si un ECP est observé. Un protocole pratique est fourni plus loin. D'autres protocoles sont disponibles avec de légères différences ainsi que leurs critères d'interprétation (2).

Selon les espèces affectées et l'origine géographique des prélèvements il peut être approprié de faire une épreuve simultanée pour la maladie vésiculeuse du porc (MVP) ou pour la stomatite vésiculeuse (SV). Idéalement un diagnostic différentiel complet de toutes les maladies vésiculeuses devrait être entrepris.

Un sérum de lapin dirigé contre les particules 146S de chacun des 7 sérotypes du virus FA (plus les virus MVP et SV si requis) est utilisé comme anticorps de capture à une concentration optimale prédéterminée en tampon carbonate/bicarbonate, pH 9,6.

Des témoins antigènes sont préparés à partir de cultures cellulaires de souches sélectionnées pour chacun des 7 types viraux FA (plus les virus MVP et SV si c'est approprié). Les surnageants non purifiés sont utilisés et pré-titrés sur des plaques ELISA. La dilution finale choisie est celle qui donne une absorbance au sommet de la partie linéaire de la courbe de titrage (densité optique aux environs de 2,0). Ainsi les dilutions de raison 5 des témoins antigènes utilisés dans l'épreuve donnent-ils les 2 valeurs les plus basses en densité optique dont est dérivée la courbe de titrage. Du PBS contenant 0,05 % de Tween-20 et du rouge de phénol comme indicateur, est utilisé comme diluant (PBST).

Un anti-sérum, préparé sur cobaye par inoculation de particules 146S d'un des 7 sérotypes FA (plus MVP si nécessaire) et prébloqué avec du sérum bovin normal, est utilisé comme anticorps détecteur. Des dilutions optimales et prédéterminées en sont préparées en PBS contenant 0,05 % de Tween-20 et 5 % de poudre de lait écrémé.

Des immunoglobulines de lapin ou de mouton anti-cobaye, conjuguées à la peroxydase de raifort et prébloquées avec du sérum bovin normal sont utilisées diluées en PBST à une concentration optimale prédéterminée. Une alternative à l'utilisation des immunoglobulines est l'utilisation des anticorps monoclonaux (AcMs) qui peuvent être fixés à la plaque ELISA comme anticorps de capture ou conjugués à la peroxydase comme anticorps de détection.

- **Protocole**

- i) La surface intérieure des cupules des plaques ELISA est saturée de sérum de lapin anti-virus dilué en tampon carbonate/bicarbonate pH 9,6 à raison de 50 µl par cupule. Les rangées A à H reçoivent respectivement l'anti-sérum contre les sérotypes O, A, C, Asia-1, SAT1, SAT2, SAT3 ainsi que anti-MVP et anti-VS (optionnel) ;
- ii) Laisser les plaques à 4°C pendant la nuit soit immobiles soit dans une étuve à 37°C pendant 1 h sur un agitateur orbital réglé sur 100 à 120 révolutions /min ;
- iii) Préparer la suspension du prélèvement à tester, (surnageant de culture sur cellules non dilué et clarifié ou suspension représentant 20 % du prélèvement original ;
- iv) Les plaques ELISA sont lavées 5 fois avec du PBS ;
- v) Dans chaque plaque, ajouter dans chaque cupules des colonnes 4, 8 et 12 un volume de 50 µl de PBST. Ensuite ajouter 50 µl de PBST aux cupules 2 et 3 des rangées A à H de la plaque N°1. À la cupule 1 de la rangée A ajouter 50 µl du témoin de l'antigène type O, et dans la cupule 2 de la rangée A ajouter 12,5 µl du témoin de l'antigène de type O. Mélanger antigène et diluant dans la cupule 2 et transférer 12,5 µl de la cupule 2 dans la cupule 3 de la rangée A. Mélanger puis rejeter 12,5 µl de la cupule 3 (ceci donne une dilution de raison 5 pour l'antigène de type O). Répéter de façon similaire pour l'antigène A et continuer pour les antigènes de type C, Asia-1, SAT1, SAT2, SAT3 et MVP quand c'est approprié. Il est bien sûr nécessaire de changer les pointes de micro-pipette pour chaque antigène. Le reste de la plaque peut être chargé avec des prélèvements à tester. Ajouter 50 µl des prélèvements aux cupules 5, 6 et 7 des rangées A à H. Le second prélèvement est placé de la même façon dans les colonnes 9, 10 et 11 des rangées A à H.

S'il y a plus de 2 prélèvements à tester en même temps, les autres plaques ELISA doivent être utilisées comme suit :

répartir 50 µl de PBST dans les cupules des colonnes 4, 8 et 12 (Colonnes des témoins de tampon) au niveau des rangées A à H. Noter que des témoins antigènes ne sont pas requis pour ces plaques. Ces prélèvements à tester peuvent être ajoutés sous un volume de 50 µl dans les rangées A à H respectivement pour les colonnes 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10 et 11 ;

- vi) Couvrir la plaque et la placer sur un agitateur orbital à 37°C pendant 1 h ;
- vii) Laver les plaques abondamment avec du PBS laver 3 fois comme précédemment, égoutter et sécher complètement les plaques ;
- viii) Transférer 50 µl de chaque dilution de sérum de cobaye dans chaque cupule de la plaque et dans l'ordre approprié par exemple les rangées A à H reçoivent respectivement les anti-sérums O, A, C, Asia-1, SAT1, SAT2, SAT3 ainsi que anti-MVP et anti-VS (optionnel) ;
- ix) Couvrir les plaques avec un film et replacer sur l'agitateur orbital et incubé à 37°C pour 1 h ;
- x) Les plaques sont lavées de nouveau 3 fois, et 50 µl de sérum de lapin anti-immunoglobulines de cobaye conjugué à la peroxydase de raifort sont ajoutés à chaque cupule. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 1 h sur un agitateur rotatif ;
- xi) Les plaques sont lavées encore 3 fois puis on ajoute à chaque cupule 50 µl de la solution de substrat contenant 0,05 % de H₂O₂ avec de l'orthophénylène diamine ou un autre chromogène approprié ;
- xii) La réaction est arrêtée après 15 min par addition de 50 µl d'acide sulfurique 1,25 M. Les plaques sont lues à la longueur d'onde de 492 nm grâce à un spectrophotomètre que l'on peut relier à un ordinateur.

- **Fixation du complément**

En général, l'ELISA est préférable à la réaction de fixation du complément (FC) parce que l'ELISA est plus sensible et n'est pas affecté par les pouvoirs anti ou pro-complémentaires. Si les réactifs ELISA ne sont pas disponibles, la fixation du complément (FC) peut être pratiquée comme suit :

Les anti-sérums contre chaque sérotype aphteux sont dilués dans du tampon véronal (TV) à partir d'une dilution initiale de 1/16 en suivant une progression de raison 1,5. Laisser 25 µl des dilutions sériques successives dans chaque cupule en forme de U d'une microplaque appropriée. À ces 25 µl sont ajoutés 50 µl de complément à 3 unités, suivis de 25 µl de la (les) suspension (s) à tester. Le système est ensuite incubé à 37°C pendant 1 h, puis on ajoute 25 µl d'une suspension standardisée à 1,4 % de globules rouges de moutons (GRM) en TV eux-mêmes sensibilisés avec 5 unités de sérum hémolytique de lapin. Les réactifs sont incubés à 37°C pour encore 30 min et les plaques sont centrifugées, puis lues. Des témoins appropriés sont préparés pour contrôler le pouvoir anticomplémentaire éventuel des suspensions virales et des anti-sérums ainsi que le bon fonctionnement du système hémolytique et complémentaire. Les titres en FC sont exprimés comme la réciproque de la dilution sérique produisant juste 50 % d'hémolyse (méthode FC 50 %). Un titre FC ≥ 36 est considéré comme positif. Les titres d'une valeur de 24 doivent être confirmés par une seconde épreuve utilisant le passage en culture cellulaire du prélèvement en question.

c) Méthodes de reconnaissance de l'acide nucléique

La transcription inverse couplée à l'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) peut être utilisée pour amplifier des fragments de génome du virus FA dans du matériel de diagnostic (3, 9). Des amorces spécifiques ont été réalisées pour distinguer entre chacun des 7 sérotypes. Des techniques d'hybridation *in situ* ont été développées pour la recherche de la présence de l'ARN du virus FA dans les fragments de tissus (47). Ces techniques sont beaucoup utilisées actuellement.

L'épidémiologie moléculaire de la FA est basée sur la comparaison des différences génétiques entre isolats viraux. Des dendogrammes montrant les relations génomiques entre les souches vaccinales et les souches du terrain ont été publiés pour les 7 sérotypes sur la base des séquences dérivées du gène D1. L'amplification par la réaction de RT-PCR de l'ARN viral FA, suivie par le séquençage nucléotidique reste la méthode actuellement préférée pour générer les données de séquences permettant ces comparaisons. Beaucoup de laboratoires ont développé ces techniques pour mener à bien ces études et les laboratoires de référence détiennent des bases de données contenant plus de 3 000 séquences partielles.

La méthode recommandée consiste à :

- i) extraire l'ARN viral FA directement de la suspension épithéliale ou d'un bas passage sur culture cellulaire ;
- ii) pratiquer une RT-PCR sur le gène VP1 complet (ou seulement sur la partie du gène VP1 incluant la terminaison 3') ;
- iii) déterminer la séquence nucléotidique du produit obtenu par PCR (ou au moins des 170 nucléotides à l'extrémité 3' de ce gène, nombre porté à 420 pour les types SAT ;

Un protocole complet avec les séquences des amorces est disponible auprès des Laboratoires de référence de l'OIE sur simple demande ou peut être téléchargé depuis les sites internet suivants :

<http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/picornaviridae/aphthovirus/fmd.htm>

<http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/SerManDid17.pdf>

2. Épreuves sérologiques

L'infection par le virus FA peut être diagnostiquée par la détection d'une réponse spécifique d'anticorps. Les épreuves généralement utilisées sont la séroneutralisation ou neutralisation virale (SN) et l'ELISA (26, 27, 44). Celles-ci sont aussi les épreuves préconisées pour les échanges commerciaux. L'épreuve de SN est spécifique de type et requiert l'utilisation de la culture cellulaire. Il prend 2 à 3 jours pour fournir les résultats. L'ELISA employé est une variante par blocage ou par compétition, qui utilise des anticorps spécifiques polyclonaux ou monoclonaux. L'ELISA est donc spécifique de sérotype, sensible et quantitative et présente l'avantage d'être plus rapide à mettre en pratique, il est moins variable et n'est pas dépendant des systèmes de culture cellulaire. De fausses réactions positives à faible titre peuvent être observées, mais dans une faible proportion des sérums dans l'une ou l'autre des variantes. Une approche combinant un criblage par ELISA et une confirmation des cas positifs par SN minimise l'observation de résultats faussement positifs. L'OIE a coordonné la production de sérum de référence pour standardiser les épreuves sérologiques de la FA ; ceux-ci sont disponibles auprès du LMR (WRL-Pirbright).

La détection des anticorps dirigés contre les protéines non structurales (PNS) du virus FA a été utilisée pour identifier une infection passée ou présente avec n'importe lequel des 7 sérotypes, que l'animal ait été vacciné ou non. Par convention, ceci a été pratiqué dans le passé par la mesure en immunodiffusion en gel (34), des anticorps dirigés contre l'antigène associé à l'infection virale (AAIV ou VIAA en anglais) qui n'est autre que la

protéine de l'ARN polymérase 3D. Bien que relativement peu sensible, l'épreuve est bon marché, facile à mettre en œuvre et a été utilisée extensivement en Amérique du Sud pour détecter une activité virale à l'échelle des populations pendant les campagnes d'éradication de la FA. L'épreuve de l'AAIV-VIAA est maintenant remplacée avantageusement par la mesure des anticorps dirigés contre des PNS obtenues par des techniques de recombinaison utilisant une grande variété de systèmes d'expression *in vitro*. Cette approche était particulièrement appropriée pour suivre les progrès des campagnes d'éradication en Amérique du Sud. Les anticorps dirigés contre les polyprotéines 3AB ou 3ABC sont généralement considérés comme les plus sûrs indicateurs de l'infection (10, 13, 32, 33, 42). Chez les animaux séropositifs pour les anticorps anti-3AB ou anti-3ABC, la détection des anticorps contre une ou plus des autres PNS incluant les protéines L, 2C, 3A, 3B ou 3D est une confirmation supplémentaire de l'infection (10, 11, 32, 36, 42). L'épreuve peut être utilisée pour détecter l'infection FA chez des populations vaccinées ou non vaccinées. Cependant la pureté du vaccin est importante à considérer, car la présence de faibles quantités de PNS dans certains vaccins peut entraîner de fausses réactions positives chez les animaux qui ont été vaccinés de façon répétée. Des procédures pour l'évaluation de la pureté vaccinale sont présentées dans la Section C de ce chapitre. Inversement il existe des preuves expérimentales que quelques animaux vaccinés et ultérieurement testés expérimentalement avec un virus virulent et confirmés comme infectés permanents, sont restés indétectables avec certaines épreuves anti-PNS, donnant des résultats faussement négatifs (30). En conséquence les épreuves pour les PSN doivent être utilisées sur la base du troupeau et non sur une base individuelle pour la détection de la circulation du virus FA dans les populations vaccinées.

a) Séroneutralisation (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

La microépreuve de SN pour les anticorps FA est pratiquée sur cellules IB-RS-2, BHK-21, cellules rénales d'agneau ou de porc dans des microplaques à fond plat destinées aux cultures cellulaires.

Le stock de virus est cultivé sur cellules en monocouche et conservé à -20°C après addition de 50 % de glycérol (le virus est stable dans ces conditions pour au moins 1 an). Les sérums sont inactivés à 56°C pendant 30 min avant d'être testés. Le sérum témoin standard est un sérum de 21 jours post-vaccination ou de convalescent. Un milieu de culture conseillé est le milieu complet de Eagle (solution saline équilibrée de Hanks avec extrait de levure et hydrolysate de lactalbumine et antibiotiques).

L'épreuve utilise des volumes égaux de 50 µl.

• Protocole

- i) Partant d'une dilution au ¼, les sérums sont dilués en série de deux en deux à travers de la plaque, en utilisant au moins 2 rangées de cupules par sérum, et au mieux 4 rangées. Utiliser un volume de 50 µl ;
- ii) Le virus est utilisé à titre fixe, pré-titré et est ajouté sous un volume de 50 µl. La suspension virale doit contenir environ 100 DECP₅₀/ml (doses effet cytopathogène 50 % par ml de culture). L'amplitude des variations admises va de 35 à 350 DECP₅₀ ;
- iii) Les témoins comprennent un antisérum standard au titre connu, un sérum négatif et un témoin pour les cellules, un pour le milieu de culture et un titrage viral utilisé pour calculer le titre véritablement utilisé dans l'épreuve de SN ;
- iv) Incuber à 37°C pendant 1 h avec les plaques couvertes ;
- v) Une suspension de cellules en suspension à 10⁶ cellules/ml est préparée dans un milieu pour la croissance cellulaire contenant 10 % de sérum bovin vraiment négatif en anticorps de la FA. Un volume de 50 µl de suspension cellulaire après croissance est ajouté dans chaque cupule ;
- vi) Les plaques sont scellées avec un film laissant passer l'air et sont incubées à 37°C pendant 3 jours. Une autre manière de procéder est d'utiliser des couvercles de plaques prévus à cet effet et de procéder à l'incubation de manière identique, mais dans une atmosphère avec 3 à 5 % de dioxyde de carbone ;
- vii) Les lectures au microscope peuvent être faites dès le 2^e jour révolu. Les plaques sont habituellement fixées et colorées au 3^e jour écoulé. La fixation est faite en utilisant une solution saline titrant 10 % en formol laissée en contact pendant 30 min. Pour la coloration, les plaques sont immergées 30 min. dans une solution de formol à 10 % et de bleu de méthylène à 0,05 %. Une autre méthode utilise une solution de naphthalène bleu noir à 0,4 % p/v avec 8 % p/v d'acide citrique en tampon salin. Ensuite les plaques sont rincées sous le robinet et mises à sécher retournées ;
- viii) Les cupules positives (où le virus a été neutralisé et où les cellules sont restées intactes) sont visibles car colorées en bleu et les cupules négatives (où le virus n'a pas été neutralisé) sont vides et transparentes. Les titres sont exprimés comme la dilution finale de sérum présente dans le mélange sérum/virus au point 50 % par la méthode de Kärber. L'épreuve est considérée comme valide quand la quantité de virus utilisée dans chaque cupule est dans la fourchette log₁₀ 1,5-2,5 DECP₅₀ et si le sérum positif de référence présente une valeur comprise entre ± 0,3 log₁₀ ;

- ix) L'interprétation des épreuves peut varier selon les laboratoires au regard du point final choisi. Les laboratoires doivent établir leurs propres critères par référence à un réactif standard qui peut être obtenu au Laboratoire mondial de référence pour la FA, de la FAO-OIE (voir note de bas de page n°1). En général, un titre de 1/48 ou plus, lu dans les conditions exposées plus haut est considéré comme positif. Des titres de 1/16 à 1/32 sont considérés comme douteux et plus d'échantillons de sérums sont requis pour l'épreuve. Les animaux sont considérés comme positifs si un second échantillon obtient encore un titre de 1/16 ou plus. Un titre de 1/8 ou moins est considéré comme négatif.

b) Test ELISA par compétition en phase solide (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Un anti-sérum de lapin spécifique de l'antigène 146S d'un des 7 sérotypes du virus FA est utilisé comme anticorps de capture à une concentration optimale prédéterminée en tampon carbonate/bicarbonate, pH 9,6.

Les antigènes sont préparés par inactivation de virus propagés en culture de cellules en utilisant l'éthylèneimine selon les procédures décrites pour la production des vaccins. La dilution finale choisie est celle qui après addition d'un volume égal de diluant donne une absorbance située dans la partie supérieure de la région linéaire de la courbe de titrage (densité optique d'environ 1,5). Du PBS contenant 0,05 % de Tween 20 et du rouge de phénol comme indicateur, est utilisé comme diluant (PBST)

Un antisérum de cobaye est préparé par inoculation d'antigènes 146S d'un des 7 sérotypes. Après avoir été prébloqué avec du sérum normal de bovin, il est utilisé comme anticorps de détection. Des concentrations optimales déterminées au préalable sont préparées dans du PBS contenant 0,05 % de Tween 20 et 5 % de lait écrémé en poudre (PBSTL).

Des immunoglobulines de lapin (ou de mouton) anti-immunoglobulines de cobaye et conjuguées à la peroxydase de raifort et prébloquées avec du sérum normal de bovin sont utilisées à une concentration optimale déterminée au préalable (PBSTL).

Les sérums à tester sont dilués en PBST.

Des études réalisées en collaboration ont montré que l'ELISA par compétition en phase solide est plus spécifique et aussi sensible que l'ELISA de blocage en phase liquide (31).

• **Protocole**

- i) La surface intérieure des cupules des plaques ELISA est saturée en utilisant 50 µl/cupule de sérum de lapin anti-virus FA dilué en tampon carbonate/bicarbonate, pH 9,6. Laisser une nuit dans une chambre humide à 4°C ;
- ii) Les plaques ELISA sont ensuite lavées 5 fois avec du PBS ;
- iii) Ensuite 50 µl d'antigène viral FA dilué en tampon de blocage est ajouté à chaque cupule des plaques ELISA (tampon de blocage : 0,05 % [p/v] Tween 20, 10 % [v/v] sérum normal de bovin, 5 % [v/v] sérum normal de lapin). Les plaques sont couvertes et placées sur un agitateur orbital à 37°C pendant 1 h ;
- iv) Après lavage 5 fois avec du PBS, 40 µl de tampon de blocage sont ajoutés à chaque cupule, suivis de 10 µl de chaque sérum à tester (ou du sérum témoin), donnant ainsi une dilution initiale du sérum au 1/5 ;
- v) Immédiatement un volume de 50 µl de sérum de cobaye anti-virus FA dilué en tampon de blocage est ajouté donnant une dilution sérique finale de 1/10 ;
- vi) Les plaques sont couvertes et incubées sur un agitateur orbital placé à 37°C pendant 1 h ;
- vii) Après lavage 5 fois avec du PBS, on ajoute 50 µl d'immunoglobulines anti-cobaye conjuguées, diluées en tampon de blocage. Les plaques sont couvertes et incubées pendant 1 h à 37°C sur un agitateur orbital ;
- viii) Après lavage 5 fois avec du PBS, on ajoute 50 µl de la solution de substrat, contenant 0,05 % H₂O₂ plus de l'orthophénylène diamine ou un autre chromogène adéquat ;
- ix) La réaction est stoppée après 10 min par addition de 50 µl d'acide sulfurique 2 M. Les plaques sont lues à 492 nm avec un spectrophotomètre relié à un ordinateur ;
- x) *Témoins* : sur chaque plaque, 2 cupules sont utilisées comme témoin du conjugué (pas de sérum de cobaye), 4 cupules pour chacun des sérums fortement et faiblement positifs, 2 cupules pour le sérum négatif et 4 cupules pour le témoin d'absence de compétition (pas de sérum à tester) ;
- xi) *Interprétation des résultats* : un pourcentage d'inhibition est calculé pour chaque cupule, soit visuellement, soit en utilisant un ordinateur muni du programme approprié, (100 – [densité optique de chaque épreuve ou valeur du témoin divisée par la moyenne de la densité optique des cupules avec absence de compétition] × 100 %), représentant la compétition entre les sérums à tester et le sérum de

cobaye anti-virus FA sur la plaque ELISA. Les laboratoires doivent valider leurs manipulations en terme de valeur de seuil (cut-off) au dessus duquel les sérums seront considérés comme positifs, et ce en relation avec (i) les sérotypes particuliers et les souches de virus utilisées, (ii) le but du contrôle (iii) et la population contrôlée, tout ceci en utilisant les méthodes décrites au Chapitre 1.1.3., « Principes de validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses ». Au laboratoire mondial de référence, pour le sérotype O dans toutes les espèces et dans le but de démontrer l'absence d'infection dans une population immunologiquement vierge, une inhibition de 60 % est considérée comme une réaction positive (38). Des pourcentages d'inhibition entre 30 % et 60 % sont considérés comme douteux et doivent être testés de nouveau. Des valeurs égales ou supérieures à 30 % lors de la seconde épreuve doivent être considérées comme positives (31).

c) Test ELISA de blocage en phase liquide.

Les antigènes sont préparés à partir de souches sélectionnées de virus FA ayant cultivé sur cellules BHK21 en monocouche. Les surnageants non purifiés sont utilisés et pré-titrés dans une série de dilutions de 2 en 2 mais sans sérum. La dilution finale choisie est celle qui, après addition d'un volume égal de diluant (voir plus bas) donne une absorbance située dans la partie supérieure de la région linéaire de la courbe de titrage (densité optique d'environ 1,5). Du PBS contenant 0,05 % de Tween 20 et du rouge de phénol est utilisé comme diluant (PBST). Les autres réactifs utilisés dans l'épreuve sont les mêmes que ceux décrits pour l'ELISA de blocage en phase solide. Un exemple de procédure de l'épreuve est décrite ci-dessous. La température et les temps d'incubation peuvent varier en fonction du protocole.

• **Protocole**

- i) L'intérieur des cupules des plaques ELISA est saturé en utilisant 50 µl/cupule de sérum de lapin anti-146S testé auparavant. Laisser pendant une nuit dans une chambre humide à température du laboratoire ;
- ii) Les plaques ELISA sont lavées 5 fois avec du PBS ;
- iii) Dans des plaques à cupules en U (plaques porteuses) on procède à une dilution de raison 2 de chaque sérum à tester sous un volume de 50 µl en partant de la dilution 1/4. Chaque dilution est faite en double. À chaque cupule on ajoute 50 µl d'une dose constante d'antigène viral homologue du sérum de lapin utilisé pour sensibiliser la plaque. Le mélange est laissé toute la nuit à 4°C ou incubé à 37°C pendant 1 h. L'adjonction de l'antigène augmente au 1/8 la dilution de départ du sérum ;
- iv) Ensuite 50 µl du mélange sérum/antigène est transféré des plaques porteuses vers les plaques saturées avec le sérum de lapin qui sont ensuite incubées à 37°C pendant 1 h sur un agitateur orbital ;
- v) Après lavage, on ajoute à chaque cupule 50 µl de sérum de cobaye, homologue de l'antigène viral utilisé dans l'étape précédente (iv). Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 1 h sur un agitateur orbital ;
- vi) Les plaques sont lavées 3 fois, puis on ajoute à chaque cupule 50 µl d'immunoglobulines de lapin anti-immunoglobulines de cobaye et conjuguées à la peroxydase de raifort. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 1 h sur un agitateur orbital ;
- vii) Les plaques sont de nouveau lavées 3 fois et on ajoute à chaque cupule 50 µl de la solution de substrat contenant 0,05 % H₂O₂ avec de l'orthophénylène-diamine ou un autre chromogène acceptable ;
- viii) La réaction est arrêtée après 15 min par addition de 50 µl d'acide sulfurique 1 M. Les plaques sont lues à 492 nm grâce à un spectrophotomètre en relation avec un ordinateur ;
- ix) *Témoins* : un minimum de 4 cupules des sérums bovins de référence suivants doit être inclus pour chaque plaque : sérum bovin fortement positif, faiblement positif et négatif à la dilution finale du 1/32. Prévoir aussi un nombre équivalent de témoins antigènes (antigène et diluant seul sans sérum). Pour un titrage au point d'extinction, il faut ajouter une double série de dilution de raison 2, des sérums positifs et négatif, au moins sur une des plaques par séance de titrage ;
- x) *Interprétation des résultats* : les titres en anticorps sont exprimés au point d'extinction 50 %, c'est-à-dire la dilution pour laquelle la réaction du sérum à tester donne une densité optique égale à 50 % de la médiane de la densité optique de la réaction de l'antigène témoin (Kärber). À partir des 4 cupules des réactions témoins et après élimination de la cupule ayant la valeur la plus haute et de celle ayant la valeur la plus basse, la médiane est calculée comme la moyenne des valeurs des 2 cupules restantes. On peut aussi utiliser la valeur moyenne après avoir décidé des limites de tolérance pour la variation inter-cupule. Les titres au dessus du 1/40 sont considérés comme positifs. Les titres proches de 1/40 doivent être testés de nouveau par séroneutralisation sur cellules.

d) Méthodes pour les anticorps contre les protéines virales non structurales

Les anticorps dirigés contre des protéines non structurales recombinantes du virus FA peuvent être mesurés par ELISA ou par immuno-empreinte. Dans un certain nombre de laboratoires, plusieurs tests par ELISA indirect ont démontré leur sensibilité, spécificité et reproductibilité. Ces tests ELISA utilisent soit des antigènes purifiés et adsorbés directement dans les microplaques, soit utilisent des anticorps polyclonaux ou monoclonaux pour piéger les antigènes spécifiques de préparations semi-purifiées (11, 13, 32). Un ELISA de compétition a été aussi développé (42). Des exemples d'ELISA et d'une technique d'immuno-empreinte sont décrits en détail plus loin.

Comme mentionné déjà, les épreuves par immunodiffusion en gélose pour détecter les anticorps anti-VIAA (*Virus Infection Associated Antigen* ou protéine 3D ou polymérase de l'ARN) ont été largement utilisés en Amérique du Sud (34). Ils ont été remplacés depuis par l'ELISA et l'immuno-empreinte.

- **Test ELISA Indirect**

- **Préparation des antigènes recombinants (voir plus loin Section B.2.d. Épreuve par EITB ou *Enzyme-linked ImmunoElectroTransfer Blot*)**

- **Protocole**

- i) Les cupules des microplaques sont saturées une nuit à 4°C avec 1 µg/ml d'un antigène 3ABC de fusion en tampon carbonate/bicarbonate, pH 9,6 (100 µl par cupule). Des antigènes 3ABC sont exprimés et purifiés comme indiqué pour l'épreuve EITB (36) ;
- ii) Les plaques sont lavées 6 fois avec du PBS, pH 7,2, supplémenté avec 0,05 % de Tween 20 (PBST).
- iii) Les sérums à tester (100 µl par cupule) sont ajoutés à une dilution de 1/20 en tampon de blocage constitué de PBS, à 0,05 % de Tween 20, 5 % de lait écrémé en poudre, 10 % de sérum de cheval et de 0,1 % de lysat d'*Escherichia coli*. Chaque plaque inclut une série de témoins sériques négatif, faiblement positif et fortement positif calibrés grâce aux sérums internationaux de référence qui sont décrits plus loin ;
- iv) Les plaques sont incubées pendant 30 min à 37°C et lavées 6 fois avec du PBST ;
- v) Du conjugué de lapin (peroxydase de raifort) anti-IgG d'espèce est dilué à son optimum d'utilisation en tampon de blocage, et ajouté à raison de 100 µl par cupule. Les plaques sont incubées pendant 30 min à 37°C ;
- vi) Après 6 lavages, chaque cupule est remplie avec 100 µl d'une solution de 3'3', 5'5' tétraméthylbenzidine supplémentée avec 0,004 % (p/v) de H₂O₂ en tampon phosphate/citrate, pH 5,5 ;
- vii) La réaction est arrêtée après 15 min d'incubation à la température du laboratoire par addition de 100 µl de H₂SO₄, 0,5 M. L'absorbance est lue à 450 nm et à 620 nm pour la correction du bruit de fond ;
- viii) *Interprétation des résultats* : les résultats des épreuves sont exprimés en pourcentages de positivité relative au témoin sérique fortement positif [(densité optique du sérum testé ou cupule témoin sérique / densité optique du témoin sérique fortement positif) × 100] ou encore comme un index de l'échantillon par rapport au témoin positif (échantillon / T+) relatif à un seuil de positivité. Les valeurs de seuil avec ou sans zone de méfiance, doivent être déterminées en considérant le but de l'épreuve et la population cible visée.

- **Sérums internationaux de référence**

Basés sur les méthodes des épreuves décrites plus haut, les sérums internationaux de référence ont été préparés et sont disponibles au Laboratoire de référence de l'OIE, Panaftosa, PAHO/WHO. Trois sérums de référence : un fortement positif, un faiblement positif et un négatif ont été préparés en suivant les lignes directrices de l'OIE (37). Ces sérums serviront de matériel de référence pour le calibrage des réactifs et autres méthodes de diagnostic et comme prototypes pour la production de sérums de référence nationaux ou de référence de travail. Le sérum fortement positif de référence représente le niveau supérieur en détection d'anticorps. Le sérum de référence faiblement positif représente le plus bas niveau de détection ou encore la sensibilité analytique de la méthode utilisée. Il est important de noter que la dilution du sérum faiblement positif doit être choisie de telle façon qu'il soit positif de manière certaine dans toutes les manipulations de l'épreuve. Le sérum négatif de référence qui doit être utilisé pour préparer des dilutions des sérums positifs de référence servira aussi de ligne de base ou de niveau de contrôle du bruit de fond des sérums positifs de référence.

- **L'épreuve EITB (*Enzyme-linked ImmunoElectroTransfer Blot*)**

L'épreuve EITB a été largement appliquée en Amérique du Sud pour la séro-surveillance et l'évaluation du risque associé aux déplacements des animaux. La procédure actuellement utilisée consiste en un criblage préliminaire par ELISA indirect pour les anticorps anti-protéine 3ABC, suivi par une confirmation de précision grâce à l'épreuve EITB, si les prélèvements donnent un résultat positif ou suspect. Cette combinaison des 2

méthodes est particulièrement recommandée quand la séro-surveillance est faite sur un grand nombre de prélèvements. Plus d'informations sont disponibles auprès du Laboratoire référence de l'OIE, Panaftosa, PAHO/WHO (se reporter à la liste donnée dans la Partie 3 de ce *Manuel terrestre*).

- **Préparation des bandes contenant l'antigène recombinant pour l'exécution de l'épreuve.**

- i) Les 5 protéines non structurales du virus aphteux de génie génétique, 3A, 3B, 2C, 3D and 3ABC sont exprimées dans *E. coli* C600 par thermo-induction. Le polypeptide 3D est exprimé dans sa forme complète (36), tandis que le reste des protéines est obtenu par fusion à l'extrémité N-terminal de la partie du gène de la polymérase MS-2 (43) ;
- ii) La polymérase exprimée est purifiée sur phosphocellulose, puis grâce à des colonnes de sépharose poly(U). Les protéines de fusion 3A, 3B, 2C and 3ABC sont purifiées par extraction séquentielle des extraits bactériens en utilisant des concentrations croissantes d'urée. La fraction 7M contenant les protéines de fusion est purifiée plus avant grâce à l'utilisation d'une électrophorèse sur gel de poly-acrylamide à 10 % (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis). La bande contenant la protéine de fusion est découpée du gel et éluée électriquement (36) ;
- iii) Un mélange contenant 20 ng/ml de chacun des polypeptides recombinants purifiés est séparé grâce à une SDS-PAGE à 12,5 % et transféré par électrophorèse sur un film de nitrocellulose (36).

- **Protocole**

- i) La quantité requise en bandes pour une épreuve EITB doit être évaluée en prenant en compte le fait que pour chaque feuille de nitrocellulose (définie par un gel transféré) des témoins sérums fortement positif, faiblement positif, de seuil positif et enfin négatif doit être utilisée dans l'épreuve. En général 24 bandes de nitrocellulose, chacune large de 3 mm, doivent être obtenues à partir d'un seul gel ;
- ii) Un volume de 0,8 ml de tampon de saturation (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; 0,2 % de Tween 20 ; 5 % de lait écrémé en poudre ; et 0,05 % de lysat bactérien d'*E. coli*) est ajouté dans chaque cupule. Les bandes avec les antigènes sont bloquées en les plaçant avec leurs portoirs sur un agitateur pendant 30 min à la température du laboratoire (20 à 22°C) ;
- iii) On ajoute aux cupules appropriées une dilution au 1/200 des sérums à tester et de chacun des sérums témoins. Les bandes doivent être complètement immergées, face vers le haut et maintenues dans cette position pendant tout le déroulement de la réaction ;
- iv) Les bandes restent en incubation pendant 60 min sur un agitateur à la température du laboratoire ;
- v) Le liquide est éliminé des cupules et chaque bande testée est lavée 3 fois avec une solution de lavage (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; et 0,2 % de Tween 20, 150 mM NaCl) par agitation pendant 5 min ;
- vi) La solution d'anticorps de lapin anti-immunoglobulines de bovins et conjugués à la phosphatase alcaline est ajoutée à chaque cupule de l'épreuve, et les bandes sont incubées sous agitation pendant 60 min à température du laboratoire ;
- vii) Le liquide est éliminé des cupules et chaque bande testée est de nouveau lavée 3 fois comme ci-dessus ;
- viii) On ajoute ensuite à chaque cupule la solution de substrat (constituée de 0,015 % de bromo-chloro-indolyl-phosphate / 0,03 % de bleu de tétrazolium) qui a été préparée en tampon de substrat (contenant NaCl 100 mM ; MgCl₂ 5 mM ; et du Tris-HCl 100 mM ; pH 9,3) ;
- ix) Les bandes sont incubées en plaçant les portoirs sur un agitateur orbital et restent sous agitation jusqu'à ce que le témoin indiquant les valeurs de seuil montre les 5 bandes bien distinctes et séparées. Les bandes sont alors lavées à l'eau déminéralisée courante et séchées à l'air ;
- x) *Interprétation des résultats* : Avec l'épreuve EITB, il est possible de scanner avec un densitomètre, mais une lecture visuelle, bien que plus subjective, est considérée comme parfaitement valable. Les témoins sérums de référence à la fin d'une réaction satisfaisante doivent montrer une coloration réelle pour chacun des 5 antigènes. Un prélèvement du terrain est considéré comme positif si les antigènes 3ABC, 3A, 3B et 3D (\pm 2C) montrent des intensités de coloration égales ou supérieures à celles des témoins appropriés. Un prélèvement est considéré comme négatif si deux ou plus de ces antigènes

montrent des intensités de coloration inférieures à leur témoin sérum. Les prélèvements du terrain ne répondant pas à ces 2 profils doivent être considérés comme indéterminés.

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

Le contrôle de la FA est habituellement une responsabilité nationale et, dans beaucoup de pays, le vaccin ne peut être utilisé que sous le contrôle de l'autorité compétente.

Des lignes directrices pour la production des vaccins vétérinaires sont données au Chapitre I.1.7., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ici et dans le Chapitre I.1.7. restent de nature générale et peuvent être complétées par des exigences nationales ou régionales.

Comme pour produire des vaccins contre la FA, il faut utiliser du virus virulent, les établissements de production doivent en conséquence opérer en respectant des règles de biosécurité appropriées. En particulier les établissements doivent répondre aux exigences pour le confinement des agents pathogènes du groupe 4 comme cela est exposé dans l'Annexe I.1.6.1. du Chapitre I.1.6., « La biosécurité au laboratoire de microbiologie vétérinaire » de ce *Manuel terrestre*.

La vaccination de routine contre la FA est utilisée dans beaucoup de pays ou dans des zones reconnues comme libre de FA avec vaccination ou alors là où la FA est enzootique. À l'opposé un certain nombre de pays indemnes de FA n'ont jamais vacciné leurs animaux en préférant utiliser le strict contrôle des déplacements d'animaux et, en cas de foyer, l'abattage des animaux infectés et en contact. Néanmoins, beaucoup de pays maintiennent une option de vaccination et possèdent leur propre réserve stratégique d'antigènes vaccinaux FA hautement concentrés. De telles réserves d'antigènes offrent l'opportunité de délivrer très vite des vaccins tout formulés en cas d'urgence (19).

Les vaccins contre la FA sont des préparations de cultures virales inactivées chimiquement souvent purifiées qui ont été mélangées avec un adjuvant approprié. Dans le cas des vaccins destinés aux porcs ce sont des adjuvants huileux qui sont utilisés. Les vaccins vivants contre la FA ne sont pas acceptables du fait du danger de réversion à la virulence et parce que leur usage empêche la différenciation entre les animaux infectés et les animaux vaccinés.

En raison de la présence de nombreux sérotypes de virus, beaucoup de vaccins FA sont multivalents et c'est d'une pratique commune de préparer des vaccins à partir de deux ou plusieurs sérotypes. Dans certaines régions, il est nécessaire d'introduire plus d'une souche vaccinale par sérotype pour assurer une large couverture antigénique contre les virus présents sur le terrain.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

La sélection des virus de semence doit être idéalement faite en fonction de nombreux paramètres comme la facilité à se multiplier en culture de cellules, le rendement en virus, la stabilité et la largeur du spectre antigénique (40). Les souches de production doivent être caractérisées et distribuées par les laboratoires officiels de contrôles ; elles doivent être sélectionnées en fonction de l'importance épidémiologique de chaque variant viral.

b) Méthode de culture

Quand une souche vaccinale appropriée n'existe pas, les nouveaux vaccins dérivent d'un isolat du terrain qui est adapté pour cultiver grâce à des passages en série dans des cellules en monocouche ou en suspension. Dans le but d'écartier le risque d'une éventuelle contamination de l'isolat du terrain par des virus contenant des lipides, il est recommandé d'entreprendre un traitement avec un solvant organique avant ou pendant l'adaptation virale. Il est aussi préférable de conserver un bas niveau de passages en culture cellulaire puisque le virus FA a montré des variations antigéniques au cours de telles procédures.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Les virus de semence doivent être caractérisés antigéniquement et démontrés libres des contaminants étrangers listés par les autorités d'enregistrement, puis il faut établir l'homologie avec l'isolat original, la pureté et l'efficacité vis-à-vis des virus circulant sur le terrain, virus contre lesquels la souche candidate a été sélectionnée. Ceci inclut souvent plusieurs méthodes parmi lesquelles la plus sûre est l'épreuve de protection croisée comme la PGP (test de protection de la généralisation podale) sur l'espèce-cible. Sinon

des épreuves *in vitro* (de préférence la séroneutralisation) peuvent être utilisées, ce qui requiert la disposition de sérums post-vaccinaux contre les souches vaccinales en question. Les semences virales peuvent être conservées à -20°C avec de la glycérine ou à plus basse température sans glycérine, par exemple -70°C . Pour les semences virales, le stock de travail peut être dérivé d'un passage ou plus par rapport au stock original de semence et utilisé pour infecter la culture virale finale à un taux d'environ 1 PFU (plaque forming unit / unité formant plages) pour 100 cellules.

2. Méthode de fabrication

Le virus FA doit être produit dans des systèmes à large échelle utilisant des cellules de lignées en monocouche ou en suspension dans des conditions stériles. Les cultures de cellules primaires peuvent être acceptables pour la production de vaccin si elles sont obtenues dans des conditions qui répondent aux bonnes pratiques de fabrication et sont contrôlées pour assurer l'absence d'agents contaminants. L'utilisation future des cultures de cellules primaires est en train d'être revue dans le but de leur remplacement par des lignées permanentes de cellules. Il est essentiel que toute la tuyauterie et tous les récipients soient stérilisés avec soin pour assurer qu'aucun endroit du système de production n'héberge des microorganismes. En plus des considérations générales sur la stérilité, il est important de noter que le virus est vulnérable aux attaques des enzymes protéolytiques, comme celles produites par les microorganismes (15). Le contrôle du pH et de la température sont aussi des points critiques du fait de la fragilité du virus aux acides et à la température (14). Les températures optimales à contrôler pour la croissance des cellules ou des virus sont d'environ 37°C et 26°C pour l'inactivation. Pendant les autres étapes de la production, la température doit être réduite à 4 ou 6°C . Le virus doit être maintenu à un pH d'environ 7,6 et jamais en dessous de 7,0. La méthode dite « Frenkel » n'est plus considérée comme convenable pour la croissance du virus FA en vue de la production de vaccin de la FA.

Une souche adéquate de virus est utilisée pour infecter une lignée cellulaire établie en monocouche ou en suspension, comme la cellule BHK-21. De telles cultures de cellules doivent être prouvées libres de microorganismes contaminants. Une pratique courante consiste à garder les stocks de cellules BHK congelés dans de l'azote liquide et de les revivifier quand c'est nécessaire. À la faveur de cette opération, les cellules sont multipliées dans un milieu nutritif jusqu'à un volume et une densité cellulaire appropriés pour ensemercer la culture principale. En guise d'approximation, la culture principale estensemencée pour donner une densité initiale de 0,2 à $0,5 \times 10^6$ cellules/ml, qui est estimée se multiplier jusqu'à 2 à 3×10^6 cellules/ml avant d'être infectée avec le virus.

Quand le virus a atteint son titre maximal qui est déterminé par l'infectivité, la fixation du complément ou tout autre méthode, la culture est clarifiée, souvent à l'aide d'un traitement par le chloroforme, suivi d'une centrifugation et d'une filtration. Par la suite le virus traité est inactivé par addition d'éthylène-imine (EI), usuellement sous la forme d'éthylène-imine binaire (BEI). Ceci est habituellement assuré par la dissolution de 2-bromo-éthylamine hydrobromide 0,1 M dans de la soude (hydroxyde de sodium) à 0,2 N, le tout incubé à 37°C pendant 1 h (5, 6). Le BEI formé est alors ajouté à la suspension virale maintenue à 26°C pour atteindre alors la concentration finale de 3 mM. L'inactivation est en général effectuée pendant 24 h ; elle est suivie par une seconde dose de BEI pour 24 h supplémentaires dans un récipient séparé situé dans une zone de quarantaine à l'intérieur de la zone de biosécurité. La durée du traitement BEI ainsi que la température utilisée pour l'inactivation doivent être validées pour les conditions courantes du laboratoire et pour les équipements utilisés. Après l'inactivation toute quantité résiduelle de BEI dans le produit peut être neutralisée par addition de thiosulfate de sodium jusqu'à une concentration finale de 2 %. Pour diminuer la probabilité de virus virulent n'ayant pas été en contact avec l'EI à la seconde dose, il est essentiel d'effectuer un transfert du contenu du récipient dans un second récipient stérile où l'inactivation peut être terminée complètement en 48 h.

Le virus inactivé (antigène) peut être concentré par ultrafiltration, précipitation par le polyéthylène glycol ou par adsorption avec de l'oxyde de polyéthylène (1, 46). Les antigènes concentrés inactivés peuvent être purifiés plus avant par des procédés comme la chromatographie. Ces antigènes concentrés peuvent être conservés à -70°C ou à des températures plus basses pendant de nombreuses années si nécessaire, et reconstitués en vaccin à la demande par dilution dans un tampon adéquat et addition des adjuvants (17).

Les vaccins contre la FA conventionnels sont formulés avec des adjuvants soit aqueux soit huileux. Les vaccins aqueux, qui sont les plus communément utilisés pour les bovins sont préparés par adsorption de l'antigène dans du gel d'hydroxyde d'aluminium, un des constituants du produit final. Les autres composants incluent de l'antimousse, du rouge de phénol (si cela est permis par le pays utilisateur du vaccin), de l'hydrolysate de lactalbumine, du bouillon tryptose phosphate, des acides aminés, des vitamines et les sels des tampons. Un second adjuvant, la saponine dérivée d'un arbre d'Amérique du Sud *Quillaja saponaria mollina*, est aussi incorporé ainsi que du merthiolate et du chloroforme comme conservateurs.

Les vaccins à adjuvants huileux sont formulés par utilisation d'huiles minérales comme le Marcol ou le Drakeol. Ces préparations offrent des avantages par rapport au vaccin standard à l'hydroxyde d'aluminium/saponine, l'une des plus importantes étant leur efficacité chez les porcs. Elles sont largement utilisées pour vacciner les bovins en Amérique du Sud du fait d'une plus longue durée d'immunité revendiquée. L'huile minérale est usuellement

prémélangée avec un agent émulsifiant comme le mono-oléate de mannide avant l'addition d'une certaine proportion ou de la totalité de la phase aqueuse du vaccin. Le tout est émulsifié par l'utilisation de turbine colloïdale ou d'un émulsificateur à mécanisme continu ou à flux ultrasonique. Plus complexes sont les émulsions doubles (par ex : eau dans l'huile dans l'eau) qui peuvent être produites par émulsification une fois supplémentaire dans une phase aqueuse contenant une petite quantité de détergent comme le Tween 80 (28).

Des progrès significatifs ont été faits ces dernières années par l'introduction d'adjuvants huileux « prêts à l'emploi ». Les huiles contenant des esters d'acide octadécénoïque et de 2,5 anhydro-d-mannitol par exemple, forment aisément des émulsions doubles (eau dans l'huile dans l'eau) ou mixtes qui sont à la fois stables et de faible viscosité sans nécessiter l'utilisation d'équipement compliqués d'émulsification (7, 19).

3. Contrôles en cours de fabrication

En général les titres viraux atteignent leur optimum en 24 h après infection de la culture cellulaire. Le moment choisi pour la récolte peut être fondé sur des examens, par exemple la mort des cellules. Les concentrations virales peuvent être évaluées par un test d'infectivité, des méthodes comme l'analyse sur gradient de densité en sucrose (16), ou des méthodes sérologiques. Il est préférable d'utiliser une méthode qui mesure la masse antigénique, comme l'analyse par gradient de densité en sucrose associée à la mesure de l'infectivité virale puisque les 2 propriétés ne coïncident pas nécessairement et que chaque méthode peut compléter l'autre.

Pendant l'inactivation du virus, des prélèvements à intervalles réguliers doivent être faits dans le but de suivre le rythme et la linéarité du processus d'inactivation. Le titre du virus dans chaque prélèvement est déterminé par inoculation de cellules de cultures reconnues comme très sensibles au virus FA, cellule BHK-21 ou cellules de thyroïde de bovin. De telles cultures permettent de tester des prélèvements statistiquement significatifs dans des conditions reproductibles. Le \log_{10} des infectivités des prélèvements réguliers sont reportés en fonction du temps et la procédure d'inactivation n'est pas considérée comme satisfaisante tant que la partie la plus distale de la courbe soit reconnue linéaire, et que l'extrapolation de la courbe indique qu'il reste moins de une particule infectieuse pour 10^4 litres d'antigène à la fin du temps retenu pour l'inactivation.

4. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Les contrôles pour l'innocuité (ou la non-infectivité) sont effectués avec plus d'efficacité sur l'antigène en vrac, ou sur l'antigène concentré (voir les Sections C.3 and C.5.b, plus loin). Bien qu'il soit possible de confirmer l'innocuité en testant le virus élué du vaccin, ceci n'est pas universellement applicable à toutes les formulations et n'est pas aussi sûr que le test exécuté sur les antigènes concentrés. Par exemple, la saponine influence grandement l'éluion de l'antigène FA hors des vaccins à l'hydroxyde d'aluminium/saponine (18). Si la procédure d'éluion est appropriée à une formulation particulière, elle doit ensuite être validée en ensemençant des prélèvements de vaccins en parallèle avec des traces de virus virulents (8).

Dans le but d'obtenir une approbation légale, un lot de vaccin d'essai doit être contrôlé pour son éventuelle toxicité locale et générale en suivant chaque voie d'administration recommandée au cours d'un test *in vivo* effectué avec un nombre approprié de bovins (20). Des contrôles avec doses doubles et des doses répétées de vaccins formulés pour contenir le nombre et les quantités maximales permises d'antigènes seront conduits en utilisant un protocole similaire à celui décrit plus loin pour le contrôle d'innocuité.

b) Activité

Des bovins âgés d'au moins 6 mois, n'ayant jamais été vaccinés contre la FA et provenant de régions indemnes de FA sont reconnus sans anticorps de cette maladie avant d'être utilisés pour ce contrôle. Trois groupes de 5 bovins au moins doivent être vaccinés par la voie recommandée par le fabricant. Le vaccin doit être administré à différentes doses selon les groupes par injection de différents volumes du vaccin. Par exemple : si l'étiquette déclare que l'injection de 2 ml correspond à l'administration d'une dose de vaccin, 1/4 de dose de vaccin sera obtenu en injectant 0,5 ml, et le 1/10 de dose par injection de 0,2 ml. Ces animaux et un groupe de 2 animaux témoins non vaccinés sont testés soit 3 semaines (vaccins aqueux) soit jusqu'à 4 semaines (vaccin huileux) après la vaccination, en utilisant une suspension de virus bovin pleinement virulent et approprié pour le type de virus présent dans le vaccin sous contrôle. La suspension virale doit contenir un total de 10 000 DI_{50} (doses infectieuses 50 %) sous un volume de 0,2 ml injectés par voie intradermique dans 2 sites de 0,1 ml chacun, à la surface dorsale de la langue. Les animaux sont observés pendant 8 à 10 jours. Les animaux non protégés montrent des lésions sur des sites autres que la langue. Les animaux témoins d'épreuve doivent montrer des lésions sur au moins 3 pieds. La dose protectrice 50 % (DP_{50}) contenue dans le vaccin est calculée à partir du nombre d'animaux protégés dans chaque groupe. Il existe une variété de méthodes de calcul de la DP_{50} (24), mais, en général, on préfère les calculs par la méthode de Kärber. Le vaccin doit contenir au moins 3 DP_{50} par dose pour bovin quand il est employé pour

des opérations prophylactiques de routine, bien que 6 DP₅₀ par dose soit plus couramment préférées. Dans quelques cas, un vaccin de forte activité préviendra le développement de lésions locales sur la langue au site même de l'injection d'épreuve. Pour le test de la protection de la généralisation podale (PGP) un groupe de 16 bovins de 18 à 24 mois d'âge, avec les mêmes caractéristiques décrites plus haut pour la méthode DP₅₀, sont vaccinés avec une dose entière de vaccin par la voie recommandée par le fabricant. Ces animaux et un groupe de 2 témoins non vaccinés sont testés 4 semaines ou plus après vaccination avec une souche d'épreuve qui est une suspension de virus bovin pleinement virulent et approprié pour le type d'antigène du vaccin testé. L'inoculation intradermique sur la face dorsale de la langue d'un total de 10 000 DI₅₀ (dose moyenne infectante), est pratiquée en au moins 2 points. Les animaux non protégés doivent montrer des lésions sur d'autres sites que la langue dans les 7 jours après l'inoculation. Les animaux témoins d'épreuve doivent développer des lésions sur aux moins 3 pieds. Pour les vaccins utilisés en vaccination de routine, au moins 12 animaux sur 16 vaccinés doivent être protégés. Les animaux sont observés de 7 à 8 jours après l'épreuve (45).

Les contrôles d'activité dans les autres espèces-cibles comme les moutons, les chèvres ou les buffles d'eau ne sont pas disponibles ; un contrôle satisfaisant sur bovins est considéré comme suffisant pour avaliser un usage dans d'autres espèces. Dans les circonstances où un vaccin est produit pour un usage dans une espèce particulière, il est plus approprié d'en contrôler l'activité dans cette même espèce. Cependant, vu le peu de données disponibles pour le buffle Africain et le buffle d'eau (*Bubalus bubalis*) et pour les moutons, et vu la nature inapparente de la maladie dans ces espèces, les résultats d'efficacité obtenus des bovins doivent être pris comme un bon indicateur de l' applicabilité des vaccins dans ces autres espèces.

Des contrôles indirects incluant des mesures en cultures cellulaires des anticorps post-vaccination neutralisant le virus, ou des anticorps ELISA, ou des anticorps séro-protecteurs chez les souriceaux nouveau-nés peuvent être utilisés pour évaluer l'activité d'un vaccin, à condition qu'une évaluation statistique ait établi une corrélation satisfaisante entre les résultats obtenus par le contrôle du sérotype vaccinal en question et le contrôle d'activité sur bovins (45). Par exemple, le test du pourcentage escompté de protection (PEP) est utilisé pour analyser les sérums d'un groupe d'au moins 16 bovins vaccinés et pour exprimer la probabilité pour un animal d'être protégé par la seule mesure de ses anticorps neutralisants, ou ELISA ou séro-protecteurs. Dans un groupe d'animaux ayant reçu une dose entière de vaccin, la moyenne individuelle de PEP doit être égale ou supérieure à 75 % quand 16 animaux sont utilisés ou à 70 % quand 30 animaux sont utilisés dans le groupe expérimental.

La présence d'un ou plusieurs sérotypes dans un vaccin ne diminue pas l'induction des anticorps contre un autre sérotype ou la corrélation entre titres en anticorps et protection.

c) Contrôle de la pureté du vaccin : protéines virales non-structurales

Le *Code sanitaire pour les animaux terrestres* de l'OIE stipule que, pour retrouver le statut indemne de FA suite à l'apparition d'un foyer, si le vaccin a été utilisé, l'un des critères est de contrôler les animaux vaccinés pour leurs anticorps anti-protéines virales non-structurales (PNS). De même, les pays désirant être reconnus indemnes de FA avec vaccination ont l'obligation de démontrer l'absence de virus FA circulant en apportant la démonstration que les animaux vaccinés sont libres d'anticorps contre les PNS virales résultant d'une infection virale. En conséquence, les antigènes FA utilisés pour formuler les vaccins employés dans ces circonstances doivent être purifiés pour réduire leur contenu en PNS virales. Les fabricants doivent démontrer le manque d'immunogénicité à l'égard des PNS virales comme un élément de la procédure d'enregistrement de leur vaccin de manière à en faire la revendication dans la littérature liée au produit. Une méthode de contrôle qui peut être utilisée consiste dans la vaccination répétée 3 fois en 3 à 6 mois, d'un nombre approprié de veaux, de préférence à l'aide d'au moins le double de la dose d'un mélange d'essai du vaccin contenant le nombre maximal et la quantité maximale d'antigènes permis par l'autorisation de mise sur le marché (ces veaux peuvent être les mêmes que ceux utilisés pour les contrôles d'innocuité). Les animaux vaccinés doivent être testés pour la présence d'anticorps anti-PNS virales 30 à 60 jours après la dernière vaccination en utilisant les méthodes décrites dans la Section B.2.d. de ce chapitre. Au niveau du lot de vaccin, la confirmation de la pureté du vaccin peut être apportée par la démonstration du manque de réactivité vis-à-vis des PNS virales, des sérums des animaux utilisés dans le contrôle d'activité. Il faut utiliser des sérums obtenus à 30 jours après primo-vaccination et avant l'épreuve et en comparer les résultats avec les mêmes sérums provenant des mêmes animaux mais collectés avant vaccination.

d) Durée de l'immunité

Dans le but d'établir un niveau satisfaisant d'immunité, il est usuel de pratiquer un programme de vaccination comportant 2 injections à 2 à 4 semaines d'intervalle, suivies par une revaccination tous les 4 à 12 mois. La fréquence des revaccinations dépendra de la situation épidémiologique et du type et de la qualité des vaccins employés. Dans les régions où l'accès aux animaux est difficile, il est préférable d'employer des vaccins huileux à 4 mois et 1 an d'âge, puis une revaccination annuelle.

Pour les veaux nés de mères vaccinées, la première vaccination doit être retardée aussi longtemps que possible pour permettre le déclin des anticorps maternels, mais pas après 4 mois car à cet âge une grande proportion des animaux peut répondre effectivement à la vaccination. Pour les veaux nés de mères non vaccinées, la première vaccination peut être pratiquée dès la première semaine d'âge (4).

e) Stabilité

La durée de péremption des vaccins conventionnels contre la FA est habituellement de 1 à 2 ans à 4°C. (intervalle maximal 2 à 8°C.), mais ils sont sensibles à la température et ne doivent jamais être congelés ni stockés au-dessus de 8°C. La stabilité des émulsion huileuse doit être aussi démontrée en vue de l'autorisation de mise sur le marché, en tant qu'élément de la durée de péremption.

f) Agents de conservation

Les agents de conservation les plus employés sont le chloroforme et le merthiolate. Ce dernier est utilisé à la concentration de 1/30 000 (p/v).

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Les vaccins contre la FA actuels sont inoffensifs et ne présentent pas de risque toxique pour l'utilisateur. Néanmoins une attention particulière sera portée pour éviter les auto-injections avec les vaccins en émulsion huileuse.

5. Contrôles des lots

a) Stérilité

L'antigène en vrac, les adjuvants, les tampons de dilution et le produit final formulé doivent subir des contrôles de stérilité. Ceci peut être pratiqué directement avec les composants du vaccin et le produit final, mais la méthode préférée consiste en la collecte de tout micro-organisme susceptible de contaminer le matériel examiné par l'emploi d'une membrane de filtration placée ensuite en incubation dans un milieu de culture. Cette procédure permet l'élimination des conservateurs, etc. qui peuvent inhiber la détection des micro-organismes. Des lignes directrices sur ces techniques et sur les milieux de culture qui permettent la détection d'une grande variété d'organismes sont décrites dans la Pharmacopée Européenne (réf. 21 ; se référer aussi au Chapitre I.1.5., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »).

b) Inactivation sur culture de cellules

À la suite de l'inactivation, un prélèvement de chaque lot d'antigène représentant au moins 200 doses doit être contrôlé comme étant libre de virus infectieux par inoculation d'une culture cellulaire sensible en monocouche, de préférence de la même origine que celle des cellules utilisées pour la production du virus. Il peut être préférable de concentrer l'antigène pour effectuer cela, mais dans ce cas il faudra démontrer que le matériel concentré n'interfère pas avec la sensibilité ou avec la lecture du test. Les couches cellulaires sont examinées journalièrement pendant 3 jours, après quoi le milieu utilisé est transféré sur des cultures nouvelles en mono-couche et la première culture est réalimentée en milieu nouveau. En utilisant cette méthode, des traces de virus virulent peuvent être amplifiées par passages et détectées grâce à l'ECP observé. Habituellement, 2 à 3 passages de la préparation virale originale sont réalisés. Une variante à cette méthode est de congeler/décongeler les monocouches utilisées pour libérer du virus intra-cellulaire qui pourra être détecté dans les passages suivants.

c) Innocuité sur animaux cibles

Cette méthode peut aussi confirmer l'inactivation, mais elle n'est pas aussi sensible que les méthodes *in vitro* décrites plus haut. Dans le but de libérer un lot, chaque animal d'un groupe d'au moins 2 bovins séronégatifs en FA est inoculé par la voie recommandée avec une double dose de vaccin. Les animaux sont observés pour leurs réactions locales et systémiques à la vaccination pendant au moins 14 jours. Si l'un des animaux développe des signes cliniques de FA, le lot de vaccin échoue au contrôle d'innocuité. De même, toute toxicité induite attribuable au vaccin doit être évaluée et peut empêcher l'acceptation du lot. Idéalement, les vaccins préparés pour les espèces autres que les bovins devraient être contrôlés en innocuité sur les espèces pour lesquelles ils ont été préparés en administrant une double dose de vaccin par la voie recommandée. Les animaux devraient être examinés journalièrement pendant un minimum de 14 jours en cherchant des preuves de toxicité ou des signes de FA.

d) Activité

L'activité des vaccins est seulement recherchée sur le produit final formulé (voir Section C.5.b.). La charge antigénique peut être utilisée comme un indicateur indirect de la puissance vaccinale, à condition qu'une corrélation ait été établie au préalable entre la charge antigénique, la réponse en anticorps et la protection contre l'épreuve virulente.

6. Conservation et surveillance des antigènes concentrés

La conservation des antigènes concentrés à très basse température pour les formuler plus tard en vaccin est devenue une option de plus en plus populaire pour la production du vaccin. Cela ne constitue pas seulement la base de la conservation d'antigènes dans une réserve stratégique pour utilisation d'urgence (voir Chapitre I.1.11., « Lignes directrices pour les normes internationales applicables aux banques de vaccins »), mais cela permet aussi au fabricant d'accéder immédiatement à plusieurs souches différentes d'antigènes qui peuvent rapidement être formulées et expédiées au client. De tels stockages, particulièrement pendant les périodes de basse production, minimisent plus tard les délais de livraison, particulièrement en cas de demande de vaccins multivalents. Un autre avantage de ce procédé est que de nombreuses méthodes de contrôles de qualité peuvent être réalisées très en avance par rapport à l'expédition.

a) Critères d'avant stockage

Il est nécessaire d'affirmer que les antigènes doivent être contrôlés en utilisant les normes indiquées dans les Sections C.1 à 4.

Une attention spéciale doit être portée aux rubriques suivantes :

- non présence d'agents contaminants étrangers.
Les antigènes doivent avoir été prouvés libres de la présence des agents contaminants listés par les autorités d'enregistrement.
- sensibilité de la lignée cellulaire utilisée pour détecter les virus résiduels.
Les cellules utilisées pour contrôler l'absence de virus résiduel ne sont pas convenables si une quantité de virus contenant 1 µg d'antigène 146S donne un titre infectieux inférieur à 10⁶ DECP₅₀ (21).
- procédures d'urgence pour l'acceptation provisoire d'un nouveau lot principal de semence virale (MSV-Master Seed Virus) et subséquemment la libération des vaccins formulés avec cette souche.

En cas d'incursion dans une région, d'une nouvelle souche qui est antigéniquement distincte des souches vaccinales existantes, il peut être nécessaire de développer une nouvelle souche vaccinale à partir d'un isolat représentatif du terrain. Avant que le nouveau lot de semence virale soit accepté, sa pleine conformité avec les lignes directrices appropriées doit être apportée afin de démontrer qu'il est libre de tous les agents contaminants listés par les autorités d'enregistrement, en utilisant à la fois des méthodes générales et des méthodes spécifiques auxquelles s'ajoute l'établissement de l'homologie avec l'isolat original. Le temps peut être très long pour rassembler les anti-sérums spécifiques qui neutraliseront la nouvelle souche dans les tests généraux de détection des agents contaminants et pour conduire à terme les autres tests spécifiques. Par conséquent, en situation d'urgence quand il n'y a pas le temps suffisant pour effectuer tous les contrôles sur le virus de semence, une acceptation provisoire de la nouvelle souche vaccinale doit être fondée sur une analyse du risque de possibilité de contamination par des agents extérieurs. Cette évaluation du risque devrait prendre en compte qu'une procédure validée inactivant les virus enveloppés doit être utilisée lors de l'établissement du lot de semence, et que le virus de culture est inactivé par l'action d'un inactivant chimique dont la cinétique d'action est d'ordre un.

Dans le but d'accélérer la libération des lots du vaccin formulé avec la nouvelle souche, il est acceptable que le contrôle d'activité du lot soit exécuté en utilisant un vaccin formulé avec un lot d'antigène intermédiaire en attendant que tous les lots d'antigène soient terminés pour constituer le lot final d'antigène. Ceci permettra de contrôler l'activité de l'antigène dérivé du nouveau lot de semence pendant que le fabricant continue sa production de nouvel antigène.

b) Critères de stockage

• **Locaux**

Il est important que tous les aspects du stockage de l'antigène concentré soient complètement conformes aux normes internationalement acceptées de bonne pratique de fabrication (BPF).

• **Confinement des antigènes stockés**

Le nombre de doses ou les volumes conservés sont une importante préoccupation, particulièrement quand la réserve est partagée entre Pays Membres, et il y a souvent une variation dans le nombre de doses perçues comme nécessaires par chacun des membres en cas d'urgence. Il paraît avisé de stocker les antigènes concentrés dans des unités au service de l'utilisateur afin de produire des plus petits lots répondant au désir du client. Des récipients de 1 à 2 litres peuvent servir pour préparer plus de 30 000 doses bovines. Quand les exigences portent sur de grandes quantités d'un vaccin particulier, elles peuvent être produites par plusieurs séries de production. Les responsables de banque de vaccins doivent considérer le besoin de formuler soit chaque lot en un mélange représentatif final pour les besoins des contrôles, soit de mélanger les lots individuels pour la facilité de formulation et/ou de contrôles.

Le type de récipient utilisé pour garder les antigènes concentrés est important. À de très basses températures, il est important que le matériau ne devienne pas cassant et fragile. Un bon récipient est constitué par les bouteilles moulées en polymères fluorés. Par exemple, les bouteilles en polyfluoro-alkoxy (PFA) ont une plage de résistance aux températures allant de -270°C à +250°C.

- **Étiquetage des Antigènes conservés**

Bien qu'il y ait des lignes directrices encadrant l'étiquetage des produits médicaux et vétérinaires, il n'existe rien pour les matériaux intermédiaires stockés pour les cas d'urgence comme les composants antigéniques de vaccins. À des températures très basses, les modes d'étiquetage doivent être résistants et durables. Par expérience, les bouteilles étiquetées avec une étiquette et des fils métalliques sont bien préférables si on peut écrire les informations nécessaires. Ces informations doivent inclure la souche vaccinale, le numéro de lot, la date de réception et doivent aussi inclure le nombre de récipients. Cette information doit être claire et écrite de manière indélébile. Des étiquettes en aluminium ont été utilisées pour cet emploi et elles peuvent être obtenues avec différentes couleurs de revêtement pour aider à l'identification et à la saisie des bouteilles, surtout quand plusieurs souches sont détenues dans le même conteneur. Les étiquettes métalliques permettent aussi de graver les informations de manière permanente.

- **Surveillance des performances**

Il est d'une grande importance que les antigènes concentrés soient conservés de façon optimale et surveillés régulièrement dans leurs performances pour avoir une bonne certitude sur leur efficacité au moment de leur utilisation. En conséquence des dispositions doivent être prises pour contrôler leurs performances de manière régulière et pour inclure à des intervalles de temps appropriés une expérience de contrôles complets pour attester de l'intégrité des composants antigéniques et de l'activité acceptable du produit fini. Par exemple, la surveillance de la température de stockage est normalement faite et enregistrée dans les banques de vaccins FA, tout comme l'inspection périodique des bouteilles contenant les antigènes afin de rechercher les craquelures pour les fuites possibles à la décongélation. Selon leur type, leur volume et les modalités de conservation, les bouteilles pourront être pesées pour évaluer si leur contenu se lyophilise à la longue. Quelques banques de vaccins FA ont incorporé des tests physicochimiques comme l'analyse par gradient de densité en sucrose pour suivre l'intégrité des antigènes et donc leur stabilité dans le temps et quelques autres ont pratiqué des tests *in vivo*. Néanmoins, depuis qu'il a été démontré que la durée de péremption des antigènes concentrés de la FA dépasse vraisemblablement 15 ans quand ils sont conservés à très basse température, une approche physico-chimique des contrôles apparaît suffisante.

Le calendrier suivant pour des contrôles est proposé pour la validation et la re-validation des antigènes de banques.

Temps	Contrôles
À la réception (année 0) et tous les 5 ans.	Contrôles des 146S * Le contrôle d'activité sur bovins peut se fonder sur des méthodes sérologiques si la protection a été corrélée avec les anticorps pour cet antigène ou selon la décision du responsable, il peut procéder à un contrôle « tronqué»** pour démontrer que la puissance vaccinale reste au dessus du minimum requis, mais attention ce genre de contrôle incomplet sous-estime la puissance vaccinale. (voir section sur les contrôles d'activité)
Années 2 et 4, et avant formulation en cas de besoin.	Contrôle des 146S
Tous les 5 ans	Evaluation de toutes les données des précédentes 5 années pour évaluer le besoin de remplacer l'antigène.

- * D'autres contrôles physico-chimiques comme le SDS-PAGE ont été utilisés pour évaluer l'intégrité de VP1, mais ils n'ont pas été validés pour un emploi de routine.
- ** Dans un contrôle « tronqué » tous les animaux du groupe avec le volume inférieur de dose sont estimés non protégés et donc non utilisés. Le contrôle donne en conséquence une DP₅₀ artificiellement plus basse, mais il réduit le nombre d'animaux requis.

Pour permettre les contrôles comme ci-dessus, les concentrés d'antigènes doivent inclure un certain nombre de petits échantillons représentatifs du stock initial. Ces fractions aliquotes des stocks d'antigènes consistent habituellement en petits flacons contenant environ un milligramme d'antigène.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ADAMOWICZ PH., LEGRAND B., GUERCHE J. & PRUNET P. (1974). Un nouveau procédé de concentration et de purification du virus. Application du virus de la fièvre aphteuse produit sur cellules BHK21 pour l'obtention des vaccins hautement purifiés. *Bull. OIE*, **81**, 1125–1150.
2. ALONSO A., MARTINS M.A., GOMES D.M.P., ALLENDE R. & SONDAHL M.S. (1992). Foot-and-mouth disease virus typing by complement fixation and enzyme-linked immunosorbent assay using monovalent and polyvalent antisera. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**, 249–253.
3. AMAREL-DOEL C.M.F., OWEN N.E., FERRIS N.P., KITCHING R.P. & DOEL T.R. (1993). Detection of foot-and-mouth disease viral sequences in clinical specimens and ethyleneimine-inactivated preparations by the polymerase chain reaction. *Vaccine*, **11**, 415–421.
4. AUGÉ DE MELLO P., GOMES I. & BAHNEMANN H.G. (1989). The vaccination of young cattle with an oil adjuvant foot-and-mouth disease vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre. Aftosa*, **55**, 3–14.
5. BAHNEMANN H.G. (1975). Binary ethyleneimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.*, **47**, 47–56.
6. BAHNEMANN H.G. (1990). Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethyleneimine. *Vaccine*, **8**, 299–303.
7. BARNETT P.V., PULLEN L., WILLIAMS L. & DOEL T.R. (1996). International bank for foot-and-mouth disease vaccine: assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants. *Vaccine*, **14**, 1187–1198.
8. BARTELING S.Z. & VREESWIJK Z. (1991). Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, **9**, 75–88.
9. BASTOS A.D.S. (1998). Detection and characterization of foot-and-mouth disease virus in sub-Saharan Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **65**, 37–47.
10. BERGMANN I.E., DE MELO P.A., NEITZERT E., BECK E & GOMES I. (1993). Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay with bioengineered non-structural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.*, **54** (6), 825–831.
11. BERGMANN I.E., MALIRAT V., NEITZERT E., PANIZUTTI N., SANCHEZ C. & FALCZUK A. (2000). Improvement of serodiagnostic strategy for foot and mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot. *Arch. Virol.*, **145**, 473–489.
12. CLARKE J.B. & SPIER R.E. (1980). Variation in the susceptibility of BHK populations and cloned cell lines to three strains of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.*, **63**, 1–9.
13. DE DIEGO M., BROCCHI E., MACKAY D. & DE SIMONE F. (1997). The use of the non-structural polyprotein 3ABC of FMD virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch. Virol.*, **142**, 2021–2033.

14. DOEL T.R. & BACCARINI P.J. (1981). Thermal stability of FMDV. *Arch. Virol.*, **70**, 21–32.
15. DOEL T.R. & COLLEN T. (1982). Qualitative assessment of 146S particles of FMDV in preparations destined for vaccines. *J. Biol. Stand.*, **10**, 69–81.
16. FAYET M.T. & al. (1971). Mesure physico-chimique des particules 146S du virus de la Fièvre Aphteuse. *Ann. Inst. Pasteur*, 121, 107-118.
17. DOEL T.R. & PULLEN L. (1990). International bank for foot-and-mouth disease vaccines: stability studies with virus concentrates and vaccines prepared from them. *Vaccine*, **8**, 473–478.
18. DOEL T.R. & STAPLE R.F. (1982). The elution of FMDV from vaccines adjuvanted with aluminium hydroxide and with saponin. *J. Biol. Stand.*, **10**, 185–195.
19. DOEL T.R., WILLIAMS L. & BARNETT P.V. (1994). Emergency vaccination against foot-and-mouth disease. The rate of development of immunity and its implications for the carrier state. *Vaccine*, **12**, 592–600.
20. European PHARMACOPOEIA - PHARMACOPEE EUROPEENNE (1993). Seconde Edition. Monographie No. 63. Editions du Conseil de l'Europe, Strasbourg, France.
21. EUROPEAN PHARMACOPOEIA- PHARMACOPEE EUROPEENNE (2002). Quatrième Edition. Section 2.6.1. Editions du Conseil de l'Europe, Strasbourg, France.
22. FERRIS N.P. & DAWSON M. (1988). Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular disease. *Vet. Microbiol.*, **16**, 201–209.
23. FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1984). Emerging Diseases of Livestock. Vol. 1. The Diseases and their Diagnosis, Geering W.A., ed. FAO, Rome, Italy, 43–51.
24. FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1997). Potency assessment of inactivated viral vaccines. *In: FAO Animal Production and Health Series No 35. Vaccine Manual. The Production and Quality Control of Veterinary Vaccines for use in Developing Countries*, Mowat N. & Rweyemamu M., eds. FAO, Rome, Italy, 395–409.
25. GOLDING S.M., HEDGER R.S., TALBOT P. & WATSON J. (1976). Radial immunodiffusions and serum neutralisation techniques for the assay of antibodies to swine vesicular disease. *Res. Vet. Sci.*, **20**, 142–147.
26. HAMBLIN C., BARNETT I.T.R. & HEDGER R.S. (1986). A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA. *J. Immunol. Methods*, **93**, 115–121.
27. HAMBLIN C., KITCHING R.P., DONALDSON A.I., CROWTHER J.R. & BARNETT I.T.R. (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. 3. Evaluation of antibodies after infection and vaccination. *Epidemiol. Infect.*, **99**, 733–744
28. HERBERT W.J. (1965). Multiple emulsions. A new form of mineral-oil antigen adjuvant. *Lancet*, **II**, 771.
29. 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.
30. MACKAY D.K. (1998). Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. *Vet. Q.*, **20** (Suppl. 2), 2–5.
31. MACKAY D.K., BULUT A.N., RENDLE T., DAVIDSON F. & FERRIS N.P. (2001). A solid-phase competition ELISA for measuring antibody to foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods*, **97** (1–2), 33–48.
32. MACKAY D.K.J., FORSYTH M.A., DAVIES P.R., BERLINZANI, A., BELSHAM G.J., FLINT M. & RYAN M.D. (1997). Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. *Vaccine*, **16**, 446–459.
33. MALIRAT V., NEITZERT E., BERGMANN I.E., MARADEI E. & BECK E. (1998). Detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus by means of an indirect ELISA test using bioengineered non-structural protein 3ABC. *Vet. Q.*, **20** (Suppl. 2), 24–26.

34. MCVICAR J.W. & SUTMOLLER P. (1970). Foot-and-mouth disease: the agar gel immunodiffusion precipitin test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootologic surveys. *Am. J. Epidemiol.*, **92**, 273–278.
35. MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (1986). Foot-and-mouth disease. Ageing of lesions. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
36. NEITZERT E., BECK E., AUGÉ DE MELLO P., GOMES I. & BERGMANN I.E. (1991). Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered non-structural antigens in detection of late persistent infections. *Virology*, **184**, 799–804.
37. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (2002). OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. Office International des Epizooties (OIE), 12 rue de Prony, 75017 Paris, France.
38. PAIBA G.A., ANDERSON J., PATON D.J., SOLDAN A.W., ALEXANDERSEN S., CORTEYN M., WILSDEN G., HAMBLIN P., MACKAY D.K.J. & DONALDSON A.I. (2004). Validation of a foot-and-mouth disease antibody screening solid-phase competition ELISA (SPCE). *J. Virol. Methods*, **115**, 145–158.
39. ROEDER P.L. & LE BLANC SMITH P.M. (1987). The detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Res. Vet. Sci.*, **43**, 225–232.
40. SAMUEL A.R., OULDRIDGE E.J., ARROWSMITH A.E.M., KITCHING R.P. & KNOWLES N.J. (1990). Serological analysis of type O isolates of FMD from the Middle East 1981–88. *Vaccine*, **8**, 390–395.
41. SKINNER H.H. (1960). Some techniques for producing and studying attenuated strains of the virus of foot and mouth disease. *Bull. OIE*, **53**, 634–650.
42. SORENSEN K.J., MADSEN K.G., MADSEN E.S., SALT J.S., NQUINDI J. & MACKAY D.K.J. (1998). Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch. Virol.*, **143**, 1461–1476.
43. STREBEL K., BECK E., STROHMAIER D. & SCHALLER H. (1986). Characterisation of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesised fusion proteins. *J. Virol.*, **57**, 983–991.
44. VAN MAANEN C. (1990). A complex-trapping-blocking (CTB) ELISA, using monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies directed against foot and mouth disease types A, O and C. 1. Method and characteristics. *Vet. Microbiol.*, **24**, 171–178.
45. VIANNA FILHO Y.L., ASTUDILLO V., GOMES I., FERNANDEZ G., ROZAS C.E.E., RAVISON J.A. & ALONSO A. (1993). Potency control of foot-and-mouth disease vaccine in cattle. Comparison of the 50 % protective dose and protection against generalisation. *Vaccine*, **11–14**, 1424–1428.
46. WAGNER G.G., CARD J.L. & COWAN K.M. (1970). Immunochemical studies of foot-and-mouth disease virus. VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by polyethylene glycol precipitation. *Arch. Ges. Virusforsch.*, **30**, 343–352.
47. WOODBURY E.L., ILOTT M.C., BROWN C.C. & SALT J.S. (1995). Optimization of an *in situ* hybridization technique for the detection of foot-and-mouth disease virus in bovine tissues using the digoxigenin system. *J. Virol. Methods*, **51**, 89–94.

*

* *

NB : Il existe des Laboratoires de référence de l'OIE pour la fièvre aphteuse (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).