

## FIÈVRE CATARRHALE DU MOUTON (« BLUETONGUE »)

---

### RÉSUMÉ

*La fièvre catarrhale du mouton (ou « bluetongue », BT) est une maladie infectieuse, non contagieuse, transmise par des insectes (arbovirose) aux moutons et aux ruminants domestiques ou sauvages, tels que les chèvres, les bovins, les cervidés, la plupart des espèces d'antilopes africaines et de nombreuses espèces d'Artiodactyles. Les conséquences de l'infection varient de la forme asymptomatique chez la grande majorité des animaux infectés à des formes mortelles chez un pourcentage variable de moutons, chèvres, cerfs et ruminants sauvages infectés. Les signes cliniques provoqués par l'infection, quand ils sont présents chez les ruminants domestiques ou sauvages, sont une réaction fébrile associée à des manifestations inflammatoires et congestives, de l'œdème de la face et des hémorragies et des ulcérations des muqueuses. Dans les formes sévères, la langue peut montrer des lésions importantes de congestion, devient oedémateuse et sort de la bouche. La congestion active peut s'étendre à d'autres parties du corps comme l'aîne, la région axillaire et le périnée. Une dégénérescence musculaire sévère est souvent associée. L'inflammation cutanée peut provoquer une chute de la laine. Les moutons se mettent à boiter à cause de l'inflammation des bourrelets coronaires du sabot et d'une myopathie des muscles striés. Une maladie sévère similaire observée chez les ruminants sauvages est due à un autre virus : celui de la maladie épizootique hémorragique du cerf (EHDV pour Epizootic haemorrhagic disease of deer virus) qui, comme le virus de la BT appartient au genre Orbivirus mais est classé dans un autre séro-groupe. Le virus EHD peut parfois provoquer des signes cliniques qui sont proches de ceux de la BT.*

**Identification de l'agent pathogène :** *Le virus de la fièvre catarrhale du mouton (BTV pour Bluetongue Virus) appartient au genre Orbivirus au sein de la famille des Reoviridae. Quatorze sérogroupes sont décrits au sein de ce genre. Le séro-groupe BT contient 24 sérotypes. Ces différents sérogroupes sont différenciés à l'aide d'épreuves immunologiques qui détectent des protéines virales conservées chez les virus d'un même séro-groupe. La plupart des sérogroupes sont distincts sur un plan antigénique, mais il existe de nombreuses réactions croisées entre les virus des sérotypes BT et EHD. Le sérotype de chaque virus au sein d'un séro-groupe est défini à l'aide des techniques de neutralisation virale. Les particules du BTV sont constituées par 2 capsides. La capside externe est composée de 2 protéines dont l'une est le support principal du déterminisme antigénique de la spécificité de sérotype. La capside interne à symétrie icosaédrique (« core » ou noyau) est composée de 2 protéines majeures et de 3 mineures ainsi que de 10 segments d'ARN double-brins. VP7 est la protéine majeure de la capside interne et possède les déterminants antigéniques spécifiques de groupe. L'identification du virus nécessite l'isolement et la multiplication du virus en culture de cellules puis l'utilisation de tests d'identification du séro-groupe et du sérotype. Récemment, l'utilisation de la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) a permis l'amplification très rapide de l'ARN génomique viral à partir d'échantillons cliniques et les protocoles de PCR maintenant disponibles permettent d'obtenir des informations sur le séro-groupe et le sérotype du virus.*

**Épreuves sérologiques :** *Les réponses sérologiques chez les ruminants apparaissent environ 7 à 14 jours après l'injection par le virus de la BT et persistent en général longtemps. Jusqu'à récemment, des épreuves tel que l'immunodiffusion en gélose et les techniques immuno-enzymatiques (ELISA) étaient utilisées pour détecter les anticorps du séro-groupe BT bien que ces épreuves ne permettent pas de différencier les anticorps induits par les virus de la BT ou*

de l'EHD. Un ELISA de compétition utilisant un anticorps monoclonal a résolu ce problème et l'utilisation d'ELISA de compétition est recommandée pour détecter les anticorps anti-virus de la BT. Les protocoles classiques pour déterminer la spécificité de type des anticorps sont complexes parce qu'ils nécessitent d'étudier la capacité des sérums à éprouver à neutraliser des virus de sérotypes connus dans des tests de séroneutralisation virale qui sont longs à mettre en oeuvre.

**Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique :**

Les vaccins vivants spécifiques de sérotypes sont utilisés dans plusieurs pays dans le monde comme en Afrique du sud où l'absence de vaccination conduirait à l'apparition de nombreux foyers. Les souches vaccinales atténuées sont obtenues par passages en série de souches sauvages sur embryons de poulets ou sur cultures cellulaires. Après plusieurs passages, la virulence est réduite et les virus se répliquent avec des titres faibles chez les moutons. Les souches atténuées sont tératogènes et ne devraient pas être administrées à des brebis gestantes pendant la première moitié de la gestation sous peine d'avortements ou d'anomalies fœtales. Afin de déterminer le degré approprié d'atténuation pour obtenir des souches vaccinales, un compromis est choisi entre le titre nécessaire pour réduire la virulence mais stimuler l'immunité chez le mouton et la nécessité de réduire le titre viral dans le sang afin d'empêcher l'infection des insectes hématophages. Les protocoles pour tester l'efficacité des vaccins chez le mouton sont faciles à effectuer. A l'opposé, peu d'études ont été menées pour déterminer si les souches atténuées pouvaient être transmises des animaux vaccinés à d'autres animaux par des insectes. Le fait que les souches atténuées puissent être tératogènes constitue une raison importante pour mener ces études dans des pays où ce type de vaccin est utilisé pour la première fois.

## A. INTRODUCTION

Les moucherons du genre *Culicoides* transmettent le virus de la fièvre catarrhale du mouton (ou « bluetongue », BT) à des animaux réceptifs après s'être infectés à partir d'animaux virémiques. Après une phase de réplication de 6 à 8 jours, le virus, qui a atteint les glandes salivaires, peut être transmis à un hôte vertébré pendant un repas sanguin. Les moucherons infectés le restent toute leur vie. Le rôle central des insectes dans l'épidémiologie de la BT explique que la prévalence de la maladie est déterminée par des facteurs écologiques tels que la pluviométrie élevée, la température, l'humidité, la nature des sols qui favorisent la survie des insectes (6). Dans de nombreuses régions du monde, la maladie a, par conséquent, une évolution saisonnière (13).

La BT est une maladie infectieuse, non contagieuse, transmise par des insectes (arbovirose) aux moutons et aux ruminants domestiques ou sauvages, tels que les chèvres, les cervidés, les bovins, les cervidés, la plupart des espèces d'antilopes africaines et de nombreuses espèces d'Artiodactyles. Les conséquences de l'infection varient de la forme asymptomatique chez la grande majorité des animaux infectés à des formes mortelles chez un pourcentage variable de moutons, chèvres, cerfs et ruminants sauvages infectés. Bien que la fréquence des infections chez les bovins est souvent plus élevée que chez les moutons, la maladie clinique chez les bovins est rare et les symptômes, quand ils apparaissent sont moins sévères que chez les ovins. Chez les ruminants sauvages, la maladie peut se manifester sous des formes variables allant de manifestations hémorragiques avec une forte mortalité comme chez le cerf à queue blanche de Virginie) (*Odocoileus virginianus*) jusqu'à des formes inapparentes telles que celles observées chez l'élan en Amérique du Nord (*Cervus canadensis*). Le virus de la maladie hémorragique des cervidés (EHDV) peut provoquer une maladie clinique chez les ruminants sauvages identique à celle provoquée par le virus de la BT.

Les signes cliniques provoqués par l'infection, quand ils sont présents chez les ruminants domestiques ou sauvages, sont une réaction fébrile associée à des manifestations inflammatoires et congestives, de l'œdème de la face et des hémorragies et des ulcérations des muqueuses. Des érosions épithéliales peuvent se développer sur les joues et sur les bords de la langue en regard des molaires. Dans les formes sévères, la langue peut montrer des lésions importantes de congestion, devient oedémateuse et sort de la bouche. La congestion active peut s'étendre à d'autres parties du corps comme l'aine, la région axillaire et le périnée. Une dégénérescence musculaire sévère est souvent associée. L'inflammation cutanée provoque une chute de laine. L'inflammation du bourrelet coronaire associée à des hémorragies est fréquente et peut causer des boiteries. Lorsque les moutons meurent d'une infection aiguë, les poumons présentent des lésions inflammatoires inter-alvéolaires, de l'œdème alvéolaire et l'arbre bronchique est rempli de mousse. La cavité thoracique contient plusieurs litres de liquide hémorragique et le sac péricardique présente de nombreuses pétéchies. Dans la plupart des cas, des lésions hémorragiques sont visibles à la base de l'artère pulmonaire (11).

Le BTV (*Bluetongue Virus*) appartient au genre *Orbivirus*, un des 9 genres de la famille des *Reoviridae*. Quatorze sérogroupes sont décrits au sein de ce genre. Les *Orbivirus* les plus étudiés sont ceux des sérogroupes BT, EHD et peste équine (AHS pour *African Horsesickness*). Au sein d'un séro groupe, les virus sont définis à l'aide des

tests de séroneutralisation virale et 24 sérotypes du BTV ont été identifiés à ce jour. Il y a de nombreuses réactions sérologiques croisées entre les virus des sérotypes BT et EHD (16). Aucune information sur les épreuves sérologiques spécifiques d'EHD ne sera donnée dans ce chapitre.

Les particules du BTV sont constituées par 3 couches protéiques. La capside externe est composée de 2 protéines VP2 et VP5. VP2 est l'antigène majeur de la neutralisation et est le support du déterminisme de la spécificité de sérotype. Elle est aussi responsable de l'activité hémagglutinante et permet la fixation du virus aux cellules de mammifères. La capacité d'un anticorps monoclonal dirigé contre VP5 à neutraliser le virus de la peste équine et à réagir avec la protéine équivalente d'EHDV et de BTV confirme le rôle de VP5 dans la neutralisation des *Orbivirus* et illustre l'étendue des réactions sérologiques croisées entre les membres des différents sérogroupes d'*Orbivirus* (24). L'élimination de la capside externe VP2/VP5 laisse une particule icosaédrique à 2 couches qui est composée de 2 protéines majeures, VP7 et VP3 et de 3 protéines mineures ainsi que de 10 segments d'ARN double-brin. VP7 possède les déterminants antigéniques majeurs de groupe ainsi que les épitopes utilisés dans les tests immuno-enzymatique (ELISA) de compétition (c-ELISA) pour détecter les anticorps anti-BTV. VP7 peut aussi permettre l'attachement du virus aux cellules d'insectes (39). VP7 est constituée de 2 sous-unités représentant chacune un domaine.

## B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

### 1. Identification de l'agent pathogène (épreuves prescrites pour les échanges Internationaux)

#### a) Isolement du virus

Les mêmes techniques sont employées pour les ruminants domestiques ou sauvages. De nombreux systèmes pour isoler le virus sont utilisés, mais les plus sensibles sont ceux qui reposent sur l'emploi des embryons de poulets et les moutons. L'identification du virus de la BT par inoculation au mouton peut s'avérer utile si le titre viral dans le prélèvement de sang est faible comme cela peut se produire quelques semaines après infection. Des tentatives pour isoler le virus par inoculation à des cellules en culture *in vitro* s'avèrent plus pratiques, mais la sensibilité est souvent plus faible que dans les systèmes *in vivo*. Dans une population virale, tous les virions ne sont pas identiques sur le plan génétique ; seule une faible proportion de virions présents dans le sang des animaux infectés possèdent les séquences en acides aminés au niveau des protéines qui permettent la fixation et la réplication du virus dans les cellules en culture. Cela est sans doute la raison pour laquelle l'inoculation de sang virémique contenant une faible quantité de particules virales à des cellules en culture, peut s'avérer inefficace pour détecter le virus. Des titres élevés de virus capables de se répliquer en cellules de culture peuvent être obtenus après 1 ou au moins 2 passages en embryons de poulet. La culture cellulaire est une technique très sensible pour l'isolement du virus de la maladie hémorragique du cerf.

- **Isolement du virus en embryons de poulets**

- i) Le sang est prélevé à partir d'animaux fébriles à l'aide d'un anticoagulant comme l'héparine, l'EDTA (acide éthylamine diamine tétra-acétique) ou le citrate de sodium puis les cellules sanguines sont lavées 3 fois avec une solution physiologique tamponnée au phosphate stérile (PBS). Les cellules lavées sont suspendues dans du PBS ou du chlorure de sodium isotonique ou bien conservées à +4°C ou utilisées immédiatement pour tenter l'isolement du virus.
- ii) Pour une conservation de longue durée quand la réfrigération n'est pas possible, les échantillons de sang sont prélevés dans la glycérine oxalate-phénol (10). Si les échantillons peuvent être congelés, ils doivent être prélevés dans un tampon peptone-lactose ou diméthyle sulfoxyde 10 % (36) et conservés à température inférieure ou égale à -70°C. Le virus n'est pas stable pendant de longues périodes à -20°C.
- iii) En cas de mortalité, les échantillons biologiques de choix pour tenter l'isolement du virus sont la rate et les nœuds lymphatiques. Les organes et les tissus doivent être gardés et transportés à +4°C jusqu'au laboratoire où ils seront homogénéisés dans du PBS ou en solution saline et ensuite traités comme les cellules sanguines comme décrit ci-dessous.
- iv) Les cellules sanguines lavées sont remises en suspension dans de l'eau distillée ou soniquées en PBS puis une petite quantité de 0,1 ml de la suspension cellulaire est inoculée par voie intravasculaire à 6 à 12 embryons de 9 à 12 jours d'âge. Cette technique est difficile à réaliser et nécessite une grande expérience. Des détails techniques sont décrits dans Clavijo et al (8).

- v) Les œufs sont incubés dans une chambre humide à 33,5°C et mirés tous les jours. Les mortalités embryonnaires observées dans les 24 premières heures après inoculation sont considérées comme non spécifiques.
- vi) Les embryons qui meurent entre le 2<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> jour sont conservés à +4°C et les embryons qui restent vivants au 7<sup>e</sup> jour sont tués. Les embryons morts et ceux qui ont survécu au 7<sup>e</sup> jour sont broyés en 2 groupes séparés. La totalité de l'embryon, après retrait de la tête ou d'organes particuliers comme le foie, sont broyés et les débris sont enlevés par centrifugation.
- vii) Le virus présent dans le surnageant peut être identifié directement par ELISA de capture d'antigène (18) ou indirectement par des méthodes de détection des antigènes telles que l'immunofluorescence ou une technique immunoenzymatique (immunoperoxydase) et ce après amplification en culture cellulaire comme décrit dans la section suivante.
- viii) Si aucun embryon n'est mort après inoculation du matériel biologique, un inoculum obtenu à partir du premier œuf peut être repassé sur embryons de poulets ou en culture cellulaire.

- **Isolement du virus en culture cellulaire**

Le virus peut être isolé à partir de cellules de hamster nouveau né (BHK-21), cellules de rein de singe vert africain (Vero) ou d'*Aedes albopictus* (AA). Le rendement de l'isolement effectué directement sur cellules en culture est souvent plus faible que celui obtenu par passage sur embryon de poulets. La sensibilité de l'isolement du virus en culture est d'autant meilleure que le broyat obtenu à partir d'embryons de poulets inoculés au 1<sup>er</sup> passage est ensuite inoculé aux cellules AA, suivi ensuite par une technique de détection d'antigène ou par des passages en série en cellules de mammifères en lignées telles que BHK-21 ou Vero. Un effet cytopathogène (ECP) n'est pas nécessairement observé en cellules AA. Les tapis cellulaires sont surveillés pendant 5 jours à 37°C à 5 % de CO<sub>2</sub> en chambre humide jusqu'à l'apparition d'un ECP. Si aucun ECP n'apparaît, un second passage est effectué en cellules en culture.

L'identité du virus de la FCO dans les cultures de cellules qui présentent un ECP doit être confirmée par différentes méthodes sérologiques décrites ci-dessous telles que l'ELISA de capture d'antigène, l'immunofluorescence, la technique à l'immunoperoxydase ou la séroneutralisation (SN).

- **Isolement sur mouton**

- i) Les moutons sont inoculés avec des cellules lavées, obtenues à partir de 10 ml à environ 500 ml de sang ou de 10 à 50 ml de suspension tissulaire. Les inocula sont administrés sous un volume de 10 à 20 ml par voie sous-cutanée. Des volumes supérieurs peuvent être utilisés et doivent être administrés par voie intraveineuse.
- ii) Les moutons sont surveillés pendant 28 jours et éprouvés sérologiquement par immunodiffusion en gélose (1) ou c-ELISA comme décrits ci-dessous.

## b) Méthodes immunologiques

- **Sérologies de groupe**

Les Orbivirus sont groupés en sérogroupes en fonction de leurs réactivités sérologiques avec des anti-sérums spécifiques qui détectent les protéines conservées au sein des sérogroupes comme VP7. Les réactions sérologiques croisées entre les membres des sérogroupes BT et EHD soulèvent la possibilité qu'une souche d'EHDV puisse être confondue avec une souche de BTV sur la base d'une faible réaction en immunofluorescence à l'aide d'un sérum polyclonal anti-BTV. Pour cette raison, un anticorps monoclonal spécifique du sérotype BT peut être utilisé. Certains laboratoires ont produit de tels réactifs spécifiques de sérogroupes (3, 22). En complément du typage de groupes, la méthode classique pour le typage de sérotype est la séroneutralisation virale qui utilise des méthodes décrites ci-dessous. Les méthodes les plus communément utilisées pour le typage de groupe sont les suivantes :

- i) *Immunofluorescence*

Des tapis de cellules BHK ou Vero cultivées en chambre de culture sont infectés avec des souches adaptées aux cultures tissulaires ou passées en embryons de poulets. Après 24 à 48 h à 37°C ou après l'apparition d'un ECP modéré, les cellules infectées sont fixées avec des fixateurs tels que le paraformaldéhyde, l'acétone ou le méthanol, séchés et les antigènes viraux détectés à l'aide d'anti-sérums anti-BTV et des techniques classiques d'immunofluorescence.

- ii) *ELISA de capture d'antigène (27)*

Le virus dans les broyats d'embryon de poulets, en milieu de culture ou dans des insectes infectés peut être détecté directement. Dans cette technique, les virions et/ou les cores viraux sont capturés

par des anticorps adsorbés sur le fond d'une plaque ELISA et le virus fixé est révélé à l'aide d'un anticorps secondaire. L'anticorps de capture peut être un sérum polyclonal ou un anticorps monoclonal spécifique de sérotype et les anticorps obtenus à partir de cores viraux obtenus en baculovirus ont été utilisés pour détecter le virus capturé (18).

iii) *Technique immunospot (14)*

De petits volumes (2 µl) de surnageant de cultures de cellules infectées ou des cellules infectées lysées ou soniquées sont adsorbés sur une membrane de nitrocellulose et séchés. Les sites de fixation non spécifiques sont bloqués par incubation dans une solution contenant du lait écrémé. Après incubation avec un anticorps monoclonal spécifique de sérotype BT, l'anticorps fixé est révélé en utilisant un anticorps anti-IgG de souris marquée par la peroxydase.

• **Typage du virus par neutralisation**

Les épreuves de séroneutralisation virale sont spécifiques de chacun des 24 sérotypes viraux et peuvent être utilisés pour typer un isolat viral ou peuvent permettre de déterminer la spécificité des anticorps d'un sérum. Dans le cas d'un virus non-typé, les caractéristiques des sérotypes de BTV présents dans la région évitent généralement de tenter une neutralisation à l'aide des 24 sérotypes anti-sérums surtout quand des sérotypes enzootiques ont été identifiés.

Il existe de nombreuses méthodes fondées sur les cultures de tissus pour détecter la présence d'anticorps neutralisants anti-BTV. Les cellules en lignée couramment utilisées sont les cellules BHK, Vero et L929. Quatre méthodes pour typer le virus BTV sont décrites brièvement ci-dessous. Les antisérums spécifiques des sérotypes de BTV produits sur cobayes ou lapins sont réputés induire moins de réactions sérologiques croisées entre sérotypes que les anti-sérums de bovins ou de moutons. Il est important que les anti-sérums de contrôle soient disponibles pour vérifier que les titres des antisérums sont suffisants pour neutraliser de façon comparable les virus de référence et les virus non typés ayant des titres comparables.

i) *Réduction de plages*

Le virus à typer est dilué de façon à contenir 100 unités formant plaque (PFU) et est incubé avec chacun des antisérums de référence ou sans antisérum. Les mélanges virus/antisérum sont inoculés aux tapis cellulaires et le titre viral est déterminé par une méthode de réduction de plages. Le virus non-identifié est considéré comme étant du sérotype contre lequel l'anti-sérum qui l'a neutralisé a été produit.

ii) *Inhibition de plages*

Les épreuves sont réalisées dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre contenant des tapis de cellules confluentes qui sont infectées avec environ  $5 \times 10^4$  PFU du virus de référence ou du virus non typé. Après adsorption et retrait de l'inoculum, les tapis sont recouverts d'agarose. Les anti-sérums de référence sont placés sur filtres circulaires en papier qui sont placés à la surface de la gélose. Les boîtes sont incubées pendant 4 jours au moins. Une zone de neutralisation du virus, illustrée par la survie des cellules du tapis, sera visible au niveau du disque contenant l'anti-sérum correspondant.

iii) *Méthode de neutralisation*

Environ 100 DICT<sub>50</sub> (Dose infectant 50 % de la culture tissulaire) du virus de référence ou du virus non typé sont déposés dans des cupules de 50 µl de volume de plaque de microtitrage et sont mélangés à un volume identique d'anti-sérums de référence dilué dans du milieu de culture. Environ  $10^4$  cellules sont déposées dans chaque puits sous un volume de 100 µl et après une incubation de 4 à 5 jours, la plaque est examinée à l'aide d'un microscope inversé. Le degré d'ECP est noté dans chaque puits. Les puits qui ne contiennent que des cellules ou des cellules et l'anti-sérum ne doivent pas présenter d'ECP. A l'opposé, les puits qui contiennent les cellules et le virus présentent un ECP importants. Le virus non identifié est considéré comme étant du même sérotype que le virus de référence neutralisé de la même façon par un anti-sérum.

iv) *Épreuve d'inhibition de la fluorescence (5)*

L'épreuve rapide et simple de séroneutralisation virale nécessite des concentrations différentes du virus inconnu et des concentrations standard des anti-sérums de référence. Les isolats cultivés sur cellules en culture sont dilués en série et mélangés avec chaque anti-sérum de référence dans des puits d'une lame Lab-tek pendant 1 h avant d'ajouter des cellules. Après une incubation de 16 h, les cellules sont fixées et sondées selon une méthode d'immunofluorescence à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique du sérotype BT. Le sérotype du virus correspond à la spécificité de l'antisérum qui entraîne la plus grande réduction du nombre de cellules fluorescentes.

c) **Réaction d'amplification en chaîne par polymérase (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)**

L'amplification dirigée d'acides nucléiques viraux a révolutionné le diagnostic de la BT (8, 26, 37). Les techniques d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont permis l'identification rapide de l'acide

nucléique du virus de la BT dans le sang et dans d'autres tissus des animaux infectés. Dans le cadre des échanges internationaux, la PCR a permis l'identification d'animaux négatifs en ce qui concerne la présence d'acide nucléique viral, parmi les animaux séropositifs, permettant ainsi leurs exportations. La PCR peut aussi permettre de grouper les *Orbivirus* et d'effectuer le typage en quelques jours après réception des échantillons cliniques (tel que le sang de moutons infectés). Les méthodes traditionnelles qui reposent sur l'isolement du virus et son identification sérologique peuvent nécessiter 3 à 4 semaines au moins pour obtenir des données sur le sérotype et le sérotype.

Les amorces oligonucléotidiques utilisées dérivent pour la plupart des séquences des segments 7 (codant VP7) (37), segment 6 (codant NS1) (9), segment 3 (VP3) (30), segment 10 (NS3) (4) et segment 2 (VP2) (26). La taille des produits amplifiés est généralement petite de l'ordre de plusieurs centaines de nucléotides mais peut aussi être celle d'un segment génomique complet. Dans la technique décrite ci-dessous, un produit dérivé du segment 6 de 101 nucléotides de long, est amplifié. Les amorces dérivées de gènes plus hautement conservés, tels que ceux codants VP3, VP7 et NS1, peuvent être utilisés pour réaliser un typage de groupe (c'est à dire qu'elles réagiront avec les génomes de tous les membres du sérotype BT) alors que les amorces déterminées à partir des segments codants VP2 fournissent des informations sur le sérotype. Une PCR multiplex qui dépend de la taille des produits amplifiés a été utilisée pour identifier en une seule réaction les 5 sérotypes nord-américains, à la fois séparément ou en mélange (19).

Les séquences nucléotidiques de gènes connus de BTV peuvent varier selon la localisation géographique où le virus a été isolé (17). Ceci a constitué une opportunité unique de compléter les études sur l'épidémiologie de la BT en fournissant des informations sur l'origine géographique probable des isolats, un phénomène appelé géotypage. Ainsi, la détermination des séquences nucléotidiques de régions des ARN 3 et 6 fournit des informations permettant de savoir si le virus est originaire d'Australie, d'Amérique du nord ou d'Afrique du sud. Il semble aussi que le séquençage d'isolats BTV provenant d'autres régions du monde puisse permettre une identification précise de l'origine géographique. Les relations entre séquence des produits d'amplification par PCR du segment 7 et origine géographique sont moins évidentes pour le segment 7 (38) que celles que l'on observe pour le segment 3 (17). L'utilisation du typage géographique (« topotypage ») en tant qu'outil épidémiologique dépend de la disponibilité de données de séquences obtenues à partir de nombreux isolats issus de différentes régions du monde ainsi que de leur disponibilité dans des banques de données facilement accessibles. En principe, sous réserve de la disponibilité d'un nombre suffisant de séquences du segment 2, il devrait être possible de déterminer rapidement le sérotype viral après amplification du segment 2. Afin de faciliter cette option, les nouvelles séquences obtenues d'isolats de BTV caractérisés ou non devraient être largement disponibles en les adressant sur les sites suivants :

[http://www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA\\_virus\\_proteins/](http://www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA_virus_proteins/) et  
[http://www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA\\_virus\\_proteins/btv\\_sequences.htm](http://www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA_virus_proteins/btv_sequences.htm).

Les sites web [http://www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA\\_virus\\_proteins/btv2-segment-2-tree.htm](http://www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA_virus_proteins/btv2-segment-2-tree.htm) offre des arbres phylogénétiques de nombreux isolats de BTV basés sur les séquences des segments 2. Ces données permettront de disposer d'informations pour des études épidémiologiques et l'identification de nouvelles souches et permettront de sélectionner de nouvelles amorces pour effectuer par la suite une transcription inverse couplée à une PCR (RT-PCR) et potentiellement un typage par RT-PCR.

Il a été rapporté que les acides nucléiques du BTV peuvent être détectés par PCR dans le sang des bovins et des moutons infectés pendant au moins 30 jours après isolement du virus. Il a été montré que l'insecte vecteur *Culicoides sonorensis* s'infectait et était capable de transmettre le virus lorsqu'il avait été infecté par du sang infectieux à partir duquel le virus avait été isolé et non pas à partir de sang positif par PCR mais négatif pour l'isolement viral. Les vecteurs qui ont ingéré du sang positif par PCR mais non infectieux n'amplifient pas le virus et ne le transmettent pas (23). En conséquence, les résultats des analyses PCR dans un but de diagnostic doivent être analysés avec précautions. La PCR détecte la présence du génome viral mais ne permet pas de conclure à la présence du virus infectieux.

La capacité des épreuves de PCR à détecter de très faibles quantités d'acides nucléiques a comme conséquence que ces épreuves sont extrêmement sensibles à des contaminations par des acides nucléiques exogènes. Ces derniers consistent en des amorces utilisées dans le laboratoire ou en des séquences polynucléotidiques préalablement amplifiées. Il est donc indispensable de disposer d'une zone « propre » contenant tous les équipements nécessaires pour la préparation des réactifs et des échantillons et une zone séparée avec son propre équipement pour l'amplification. Des gants en latex doivent être portés et changés fréquemment à toutes les étapes du protocole opératoire, en particulier après avoir manipulé des échantillons d'ARN ou d'ADN amplifiés. Ceci permettra d'éviter la contamination des réactifs et des échantillons par des RNases ubiquitaires et d'autres contaminants ainsi que de la contamination croisée par l'ADN. Le risque de faux positifs, causés par des contaminations de laboratoire, justifie l'importance du séquençage des produits de PCR pour déterminer si, par exemple, la séquence du produit

d'amplification obtenue est identique ou différente de celle du contrôle positif. Les résultats faussement négatifs causés par exemple, par la faible quantité des prélèvements ou l'utilisation des amorces inappropriées, peuvent être identifiés par la mise en évidence de l'incapacité à amplifier à la fois le génome de BTV et un gène de l'hôte, tel que celui de la globine, présent dans les extraits cellulaires.

La technique de PCR décrite ici implique 3 étapes séparées. Dans la première, l'ARN du virus de la FCO est extrait du sang à l'aide d'un agent chaotropique tel que le thiocyanate de guanidine (GuSCN) qui permet de dénaturer les protéines et libère les ARN viraux. De nombreuses trousse de diagnostic commerciales sont disponibles et le protocole décrit ci-dessous décrit celui de la trousse de diagnostic ISOQuick (Orca Research, Bothell, Washington, USA). Les réactifs fournis sont nombreux et leur utilisation est indiquée dans le protocole ci-dessous. D'autres trousse de diagnostic sont disponibles et l'une d'elles, Trizol (Life technologies, Grand Island, New York, USA) est particulièrement utilisée pour l'extraction d'acides nucléiques viraux à partir de la rate ou du caillot sanguin. Les manipulateurs doivent suivre les protocoles décrits pour chacune des trousse de diagnostic et utiliser les réactifs recommandés ou fournis avec la trousse de diagnostic correspondante. La seconde étape est la dénaturation des ARN double brin et la transcription inverse pour synthétiser de l'ADN complémentaire qui est amplifié par PCR. Dans le protocole décrit ci-dessus, le système TM Preamplification (Life technologies) est utilisé pour transcrire l'ARN viral et les réactifs sont ceux de Perkin Elmer pour la PCR. Des trousse de diagnostic et des réactifs équivalents sont disponibles dans d'autres compagnies. L'étape finale de la technique est l'analyse des produits de PCR par électrophorèse. Les procédures utilisées pour déterminer la séquence du produit amplifié ne sont pas décrites ici.

- **Extraction des ARN viraux**

- i) Le sang total d'animaux à éprouver ou d'animaux non infectés est prélevé sur EDTA et centrifugé à 800-1 000 **g** pendant 10 min. Le plasma est aspiré et les hématies sont doucement resuspendues en PBS stérile. Les hématies sont culottées par centrifugation à 1 000 **g** pendant 10 min et le surnageant est éliminé ;
- ii) Ensuite, 400 µl des hématies à éprouver sont ajoutés dans chacun des 4 tubes à micro centrifuger d'un volume de 1,7 ml et 400 µl des hématies « contrôle » sont ajoutés dans 2 des microtubes. Un volume identique d'eau sans RNase est ajouté dans chaque microtube ; les tubes sont vortexés rapidement pour mélanger et lyser les cellules. Deux microtubes contenant des hématies sont congelés à -70°C pour conservation et l'extraction est poursuivie en 2 exemplaires ;
- iii) Les hématies témoin et lysées sont centrifugées à 12 000-16 000 **g** pendant 10 min et le surnageant est éliminé. Ensuite, 800 µl d'eau sans RNase sont ajoutés et les tubes sont vortexés et centrifugés à la même vitesse pendant 10 min. Le surnageant est enlevé et le culot de globules rouges est séché ;
- iv) Un petit volume du virus de la BT (c'est à dire 5 µl contenant 10<sup>3</sup> à 10<sup>7</sup> PFU) est ajouté à l'un des 2 culots d'hématies témoins. Ceci constitue le témoin positif. L'autre culot d'hématies constitue le témoin négatif ;
- v) Ensuite, 75 µl de tampon (IsoQuick réactif A) sont ajoutés à chaque culot puis les culots sont vortexés vigoureusement puis 125 µl du GuSCN contenant une solution de lyse (isoQuick réactif 1) sont ajoutés. Le mélange est vortexé vigoureusement pendant 30 s ;
- vi) Avant utilisation, le tampon d'extraction fourni avec la trousse de diagnostic (isoQuick réactif 2 plus dye 2A) est mélangé vigoureusement et 500 µl sont ajoutés aux échantillons lysés. Ensuite 400 µl du tampon d'extraction (isoQuick réactif 2) sont ajoutés et les tubes sont vortexés pendant 10 s ;
- vii) Les tubes sont incubés à 65°C pendant 10 min, vortexés rapidement 5 min après et centrifugés à 12 000 **g** pendant 5 min ;
- viii) La phase aqueuse (500 µl) est transférée dans un nouveau micro tube et un volume identique de tampon d'extraction (isoQuick réactif 2) est ajouté. Les tubes sont vortexés pendant 10 secondes et centrifugés à 12 000 **g** pendant 5 min ;
- ix) La phase aqueuse (330 µl) est transférée dans un nouveau microtube et de l'acétate de sodium sous 10 % du volume initial (33 µl) et 365 µl d'isopropanol sont ajoutés. Après les avoir doucement secoués, les tubes sont placés à -20°C pendant 20 min à 1 h ;
- x) L'ARN est culotté par centrifugation à 12 000 **g** pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et 1 ml d'éthanol à 70 % est ajouté puis doucement mélangé. Après centrifugation à 12 000 **g** pendant 5 min le surnageant est retiré puis 1 ml d'éthanol à 100 % est ajouté. Les tubes sont congelés à -7°C jusqu'à ce qu'une RT-PCR soit réalisée.

• **RT-PCR :**

- i) L'ARN dans l'éthanol est centrifugé à 12 000 **g** pendant 5 min. L'éthanol est retiré et les tubes sont renversés afin de les faire sécher. Le culot, parfois difficile à visualiser peut ne pas être complètement sec ce qui rend difficile la mise en suspension. Un culot sec peut aussi tomber du tube renversé ;
- ii) Ensuite, 12 µl d'eau sans RNase sont ajoutés à chaque microtube, mélangés et chauffés à 65°C pendant 5 à 10 min. Les échantillons sont placés dans la glace ;
- iii) Dans une zone propre, les solutions mères contenant 200 µmol/µl d'amorces A, B, C et D sont préparées dans l'eau sans RNase et conservées à -70°C ;

Les amorces de la première amplification (pour amplifier les nucléotides 11 à 284 de l'ARN 6)

Amorce A : 5'- GTT-CTC-TAG-TTG-GCA-ACC-ACC-3'

Amorce B : 5'- AAG-CCA-GAC-TGT-TTC-CCG-AT-3'

Les amorces de la PCR nichée (amplification des nucléotides 170 à 270 de l'ARN6)

Amorce C : 5'- GCA-GCA-TTT-TGA-GAG-AGC-GA-3'

Amorce D : 5'-CCC-GAT-CAT-ACA-TTG-CTT-CCT-3'

- iv) Les solutions d'amorces sont diluées à une concentration de 15 à 20 pmol/µl. Les amorces pour la première PCR sont préparées en mélangeant des volumes identiques des amorces A et B. Les amorces pour la double PCR sont préparées en mélangeant des volumes identiques des amorces C et D. Des petites aliquotes des mélanges d'amorces sont congelés à -20°C ;
- v) Les tubes de PCR sont marqués et pour la première étape de synthèse, 4,0 µl d'amorces (A+B) sont ajoutés à chaque tube. Les tubes sont placés dans de la glace ;
- vi) Dans une sorbonne, l'hydroxyde de méthyl-mercure est dilué dans 50 mM (dilution au 1/20) et du bêta-mercaptoéthanol est dilué à 350 mM (dilution au 1/40) dans de l'eau sans RNase. L'hydroxyde de méthyl-mercure et le bêta-mercaptoéthanol sont réputés hautement toxiques. L'utilisation de ces 2 produits chimiques doit se faire avec énormément de précaution et le respect des réglementations est indispensable lors de leur pipetage ;
- vii) Ensuite, 4 µl des échantillons d'ARN à tester et des ARN témoins positifs et négatifs (étape ii) sont ajoutés à 4 µl du mélange d'amorces dans les tubes à PCR (38) ;
- viii) A chaque tube de PCR, 2,0 µl de la dilution au 1/20 de l'hydroxyde de méthylmercure sont ajoutés en mélangeant doucement et laissés à température ambiante avant d'ajouter 2,0 µl du beta-mercaptéthanol au 1/40. Pour des raisons de sécurité, certains laboratoires utilisent la formamide plutôt que l'hydroxyde de méthylmercure pour la dénaturation des ARN double brin. Cependant, pour une sensibilité optimale, l'hydroxyde de méthylmercure est le meilleur ;
- ix) Dans une zone "propre" est préparé un mélange d'ADN complémentaire contenant les réactifs suivants dans un volume correspondant au nombre d'échantillons à tester. La quantité nécessaire est calculée par échantillons et les réactifs sont contenus dans le Superscript TM preamplification system (Life Technologies)

Tampon 10x superscript TM (200 mM de Tris/HCl, pH 8,4 et 500 mM de KCl)	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
Mélange dNTP (10 mM de chaque nucléotide triphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1,25 µl
Dithiothreitol (DTT) (0,1 M)	2,0 µl
Transcription inverse (200 unités/µl)	0,75 µl

- x) Ensuite, 8 µl du mélange sont ajoutés à chaque tube de PCR jusqu'à un volume final de 20 µl ;
- xi) Les tubes PCR sont placés dans un thermocycleur, tel que l'appareil GeneAmp TM PCR System 9600, qui est programmé pour la transcription inverse :

Maintenir 44°C	50 min
Maintenir 4°C	durée illimitée

- xii) Les tubes sont enlevés du thermocycleur et 1 µl de RNase H et une couche de paraffine sont ajoutés à chaque tube. Le thermocycleur est programmé ainsi :

Maintenir 37°C	20 min
Maintenir 98°C	4 min
Maintenir 4°C	durée illimitée.

- xiii) Dans une zone « propre », est préparé un premier mélange d'amplification contenant les réactifs suivants et dans un volume nécessaire pour un nombre d'échantillons à tester. Tous ces réactifs, sauf l'eau, sont disponibles chez Perkin-Elmer. Les quantités sont données par échantillon

Eau sans RNase	62,0 µl
Tampon 10 X de PCR Perkin- Elmer (100mM Tris HCl, pH 8,3 et 500 mM KCl)	7,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	7,0 µl
Mélange dNTP (2,5 mM de chaque dNTP : dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4,0 µl
Taq ADN polymérase (5 unités/ µl)	0,5 µl

xiv) Le mélange est retiré de la zone « propre » et placé dans la zone d'amplification : 80 µl du mélange sont déposés dans chaque tube. La couche de paraffine ne doit pas être percée. Chaque tube contient maintenant 101 µl ;

xv) Les tubes sont placés dans un thermocycleur qui est programmé comme suit (programme correspondant à l'appareil GeneAmp PCR system 9600 - les programmes pour d'autres appareils doivent être déterminés) pour la première étape d'amplification :

1 cycle :	Maintenir 95°C	3 min,
	Maintenir 58°C	20 secondes (sec),
	Maintenir 72°C	30 sec,
40 cycles :	Maintenir 95°C	20 sec,
	Maintenir 58°C	20 sec,
	Maintenir 72°C	20 sec,
1 cycle :	Maintenir 95°C	20 sec,
	Maintenir 58°C	20 sec,
	Maintenir 72°C	5 min,
	Maintenir 4 ° C	durée illimitée.

xvi) Les tubes de PCR sont préparés pour la PCR nichée dans une zone « propre », 15 min avant la fin de la première amplification et placés sur la glace :

Eau sans RNase	17 µl par tube
Mélange d'amorces pour la PCR nichée (C+D)	4,0 µl par tube
Couche de paraffine.	

xvii) Quand la première amplification est terminée, les tubes sont retirés du thermocycleur et placés dans un poste de sécurité microbiologique (pas dans la zone propre). Ensuite, 1,5 µl du produit de première amplification sont transférés dans les tubes correspondants pour la PCR nichée contenant les amorces correspondantes, l'eau et la couche de paraffine ;

xviii) Les tubes sont placés dans le thermocycleur qui est programmé comme suit pour permettre la formation de la couche de paraffine :

Maintenir à 98°C	4 min,
Maintenir à 4 ° C	durée illimitée.

xix) Sous une hotte dédiée, le mélange de PCR nichée contenant les réactifs est préparé dans un volume suffisant pour le nombre d'échantillons qui doit être testé. Les réactifs utilisés sont les mêmes que pour la première PCR (étape xii). La quantité est indiquée par échantillon :

Eau sans RNase	17 µl
Tampon 10x de PCR	5,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	3,5 µl
Mélange de dNTP	4,5 µl
Taq ADN polymérase	0,5 µl

xx) Le mélange de PCR nichée est transféré de la hotte au thermocycleur et 30 µl sont déposés dans chaque tube. Chaque tube contient ainsi 52 µl.

xxi) Les tubes sont placés dans le thermocycleur qui est programmé comme suit pour la PCR nichée. Après remplissage, les tubes sont placés à 4°C ou à -20°C jusqu'à électrophorèse :

1 cycle :	Maintenir 95°C	3 min,
	Maintenir 58°C	20 sec,
	Maintenir 72°C	30 sec,
40 cycles :	Maintenir 95°C	20 sec,
	Maintenir 58°C	20 sec,
	Maintenir 72°C	20 sec,

1 cycle :	Maintenir 95°C	20 sec,
	Maintenir 58°C	20 sec,
	Maintenir 72°C	20 sec,
	Maintenir 4°C	durée illimitée.

- **Analyse par électrophorèse des produits d'amplification**

- D'abord, le tampon 1 X (0,045 mM Tris /borate, pH 8,6 et 1,5 mM EDTA) est préparé à partir d'une solution mère 10x. Dans le cas du système « Bio-rad Wide Mini-Sub cell », 700 ml de tampon sont préparés (100 ml pour le gel et 600 ml pour le tampon de la cuve) ;
- Une solution à 3 % d'agarose 3/1 Nusieve (FMC Bioproducts, Rockland, Maine, USA) ou d'agarose similaire est préparée dans du tampon TBE. La solution est bouillie jusqu'à dissolution totale de l'agarose puis mise à refroidir jusqu'à 40°C. Le bromure d'éthidium est ajouté à une concentration de 0,5 µg/ml à l'agarose et au tampon électrophorèse. Le bromure d'éthidium est une substance toxique. Il est indispensable de porter des gants, des vêtements de protection et des lunettes protectrices pendant la manipulation de ce produit ;
- Les extrémités du support de gel à électrophorèse sont bouchées par du scotch et la solution d'agarose est coulée. Le peigne est inséré dans l'agarose qui est laissé à solidifier pendant 30 à 60 min. Le peigne et les scotchs sont doucement retirés de la cuve à électrophorèse ;
- Le tampon d'électrophorèse est versé dans la cuve à électrophorèse puis le support du gel est placé dans la cuve de telle sorte que le tampon recouvre le gel d'agarose ;
- Les échantillons témoins positifs et négatifs sont préparés dans des microtubes de 0,65 ml comme décrit ci-dessous :

Tampon de charge (cat. G-2526, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) 5,0 µl

L'ADN amplifié et un tube supplémentaire 15 µl

Tampon de charge (cat. G-2526, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) 5,0 µl

Marqueur de 100 pb (cat. 15268, -0,19, Life technologies, grand Island, New York, USA) 1,0 µl

- Les échantillons sont déposés dans les puits correspondants du gel et mis à migrer à 65-75 V pendant 1 h à 1 h 30 jusqu'à ce que le colorant ait migré sur la moitié du gel. Le gel est transféré sur un transilluminateur et est photographié pour archivage. Utiliser un masque de protection contre UV pour visualiser les segments amplifiés ;
- Les échantillons positifs vis à vis du génome du BTV présentent des fragments de 101 pb. Pour que l'épreuve soit interprétable, le contrôle positif doit présenter un fragment avec une taille correcte et le contrôle négatif et le témoin sans « ARN » ne doivent présenter aucun fragment visible. Les échantillons sont considérés comme positifs s'ils présentent un segment d'ADN de la même taille que celui du contrôle positif. Les échantillons testés en double doivent donner des résultats identiques. S'il y a une divergence, les analyses doivent être refaites ;
- Un sac incolore (Ameresco, Solon, Ohio, USA) est placé dans le tampon d'électrophorèse toute la nuit pour enlever le bromure d'éthidium. Le tampon peut être vidé et le sac incolore, après 10 à 15 utilisations, doit être placé dans un container identifié pour élimination du bromure d'éthidium puis ensuite incinération.

Les trousse de diagnostic et les réactifs pour la réalisation de 2 épreuves sérologiques – l'immunodiffusion en gélose (IDG) et l'ELISA de compétition – sont disponibles auprès de 3 sociétés aux Etats-Unis d'Amérique (VMRD, Po box so2, Pullman, Ridge, Colorado 80033, USA ou Diagnostics, 27 Cannon Road, Wilton, Connecticut 06897, USA). Les réactifs pour ELISA-c sont disponibles auprès du laboratoire de référence européen pour la BT (Laboratoire de Pirbright, Ash Road, Pirbright, Woking, GU24 ONF, Royaume-Uni).

## 2. Épreuves sérologiques

Les anticorps anti-BTV induits chez les animaux infectés peuvent être détectés de différentes façons qui dépendent de la sensibilité et du type des épreuves utilisées. Les anticorps spécifiques de groupe et de type sont induits simultanément et si l'animal n'a pas été exposé auparavant au virus de la BT, les anticorps neutralisants produits sont spécifiques du virus qui l'a infecté. Des infections multiples par différents sérotypes provoquent la production d'anticorps capables de neutraliser des sérotypes vis-à-vis desquels l'animal n'a pas été exposé. Il y a

2 explications à ce mécanisme. Premièrement, certains sérotypes partagent des sites communs de neutralisation d'anticorps monoclonaux (AcM). Deuxièmement, certains sérotypes partagent aussi un grand nombre d'épitopes impliqués dans les réactions de neutralisation mais aussi, pour d'autres sérotypes mis en évidence dans les épreuves non-neutralisantes.

**a) Fixation du complément**

Un test de fixation du complément (7) pour détecter les anticorps anti-BTV a été largement utilisé jusqu'en 1982 puis a été remplacé par l'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) bien que le test fixation du complément soit encore utilisé dans certains pays.

**b) Immunodiffusion en gélose (IDG) (épreuve prescrite pour les échanges internationaux).**

L'épreuve d'IDG pour détecter les anticorps anti-BTV est simple à réaliser et l'antigène utilisé dans cet essai est relativement facile à produire. Jusqu'en 1992, cette analyse a été l'épreuve de référence dans les mouvements internationaux de ruminants. Cependant, un des désavantages de l'IDG est son manque de spécificité en particulier car il peut détecter des anticorps contre d'autres Orbivirus notamment ceux du sérotype EHD. Ainsi, les sérums positifs en IDG doivent être confirmés en utilisant une épreuve spécifique du sérotype BT. Le manque de spécificité et le caractère subjectif de la lecture des résultats ont encouragé le développement de techniques c-ELISA pour la détection spécifique d'anticorps anti-BTV. L'épreuve c-ELISA recommandée est décrite dans la section B.2.c.

• **Protocole**

- i) Une couche fine de 2,8 mm d'agarose à 0,9 % dans du NaCl à 85 % est préparé et des puits circulaires, de 4,0 mm de diamètre et séparés entre eux par 2,4 mm sont creusés selon le schéma de 6 puits autour d'un puits central ;
- ii) L'antigène viral est obtenu à partir d'une suspension brute de cellules BHK ou Vero infectées par un sérotype viral 24 ou 48 h auparavant. L'antigène peut être concentré par précipitation ou par ultrafiltration ;
- iii) 3 sérums positifs et 3 sérums à éprouver sont placés alternativement dans les puits qui entourent le puits central contenant l'antigène et les boîtes sont incubées entre 20 et 25°C dans un environnement humide pendant 24 h ;
- iv) Une série d'arcs de précipités entre l'antigène et les sérums témoins positifs et ceux obtenus à partir des sérums de terrain fortement positifs seront en continuité avec ceux induits par les sérums contrôlés positives. Pour les sérums de terrain faiblement positifs, les arcs de précipité s'approchent de l'antigène mais ne forment pas une ligne continue avec l'arc du sérum témoin positif correspondant. Avec les échantillons négatifs, les arcs de précipité continuent vers les puits des sérums de terrain sans s'incurver vers l'antigène ;
- v) Tous les sérums faiblement positifs et les autres sérums qui induisent des résultats douteux doivent être re-évalués en utilisant des puits de 5,3 mm de diamètre et écartés de 2,4 mm ou sont re-évalués par la technique c-ELISA décrite ci-dessous ;

**c) ELISA de compétition (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)**

L'ELISA de compétition (c-ELISA) ou de blocage pour la BT a été développé pour mesurer la réponse « anticorps anti-BTV » sans révéler les anticorps contre d'autres Orbivirus (1, 3, 22, 28, 31). La spécificité de l'épreuve repose sur l'utilisation d'un des anticorps monoclonaux anti-BTV tel que l'anticorps 3-17-A3 (3) ou 20E9 (21, 22). Les anticorps proviennent d'un grand nombre de laboratoires mais, bien que tous différents, ils semblent tous se fixer sur la région amino-terminale de la protéine majeure de « core », VP7. Dans le c-ELISA, les anticorps des sérums à éprouver sont en compétition avec l'anticorps monoclonal pour la fixation à l'antigène. Le protocole suivant a été standardisé après des études comparatives effectuées entre de nombreux laboratoires internationaux.

• **Protocole**

- i) Premièrement, l'antigène dérivé de cultures cellulaires soniquées (3) ou de la protéine majeure de core VP7 exprimée en baculovirus (29) ou en cellules de levure (25) est fixé au fond de microplaques à 96 puits par incubation pendant une nuit à +4°C ou à 37°C pendant 1 h dans un tampon de dilution de 0,05 M à pH 9,6 ;
- ii) Les plaques sont lavées 5 fois avec du tampon PBST (0,01 M PBS contenant 0,05 % ou 0,1 % de Tween 20, pH 7,2) ;

- iii) Ensuite, 50 µl de sérum à éprouver sont ajoutés en double à une dilution unique (ou bien 1/5 ou 1/10) (22) dans du PBST contenant 3 % d'albumine sérique bovine (BSA) ;
- iv) Immédiatement, 50 µl d'une dilution précédemment définie d'anticorps monoclonal dans du PBST contenant de la BSA à 3 % sont ajoutés dans chaque puits. Les puits de contrôle « anticorps monoclonal » contiennent du tampon de dilution à la plaque du sérum à éprouver ;
- v) Les plaques sont incubées pendant 1 h à 37°C ou 3 h à 25°C sous agitation continue ;
- vi) Après lavage, les puits sont remplis avec 100 µl d'une dilution appropriée d'anticorps de lapin anti-IgG (H+L) de souris marqués à la peroxydase dans du PBST contenant du sérum de bovin à 2 % ;
- vii) Après une incubation de 1 h à 37°C, la solution du conjugué est enlevée et les plaques sont lavées 5 fois à l'aide de PBS ou de PBST. Les puits sont remplis avec 100 µl du substrat contenant 1,0 mM d'ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-acide sulfonique]), 4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans 50 mM de citrate de sodium, pH 4,0) et les plaques sont agitées pendant 30 min à 25°C (d'autres substrats peuvent être utilisés et la réaction peut se poursuivre sous agitation pendant une durée adaptée pour permettre l'apparition de la couleur) ;
- viii) La réaction est arrêtée par addition d'un réactif de blocage tel que l'azide de sodium ;
- ix) Après avoir sélectionné les « blancs » sur les puits contenant le substrat et les réactifs de blocage, les valeurs d'absorbance sont mesurées à 414 nm avec le lecteur ELISA. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et sont obtenus à partir des moyennes des densités optiques (DO) de chaque échantillon par la formule suivante :  
$$\% \text{ inhibition} = 100 - \left[ \frac{\text{moyenne des DO de l'échantillon à éprouver}}{\text{moyenne des DO des puits de contrôle de l'AcM}} \right] \times 100$$
  
NB : certains laboratoires préfèrent utiliser un sérum témoin négatif qui a précédemment montré un pourcentage d'inhibition de zéro plutôt qu'un contrôle « AcM ».
- x) Les valeurs de pourcentage d'inhibition >50 % sont considérées comme positives. Les inhibitions observées entre 40 et 50 % sont considérées comme douteuses. Les résultats des sérums éprouvés en double peuvent varier tant qu'elles ne restent pas du même côté du seuil de lecture ;
- xi) Les sérums fortement ou faiblement positifs ainsi qu'un sérum négatif doivent être inclus dans chaque plaque. Le sérum faiblement positif doit donner 60 à 80 % d'inhibition et le sérum négatif doit donner moins de 40 % d'inhibition.

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

Parmi les différents types de vaccins disponibles, notamment les vaccins atténués, inactivés ou recombinants, seuls les vaccins atténués sont utilisés dans différents pays. En Afrique du Sud par exemple, ils sont utilisés depuis plus de 40 ans et sont réputés induire une immunité réelle et longue (11). L'efficacité des vaccins inactivés ayant été étudiée par différents laboratoires (15), certains sont utilisés en Europe depuis 2004.

Il y a plusieurs possibilités pour le développement de vaccins recombinants dont les virus expriment des épitopes de neutralisation de BTV et les pseudo-particules virales obtenues en cellules d'insectes infectées par des baculovirus exprimant les 4 protéines majeures VP2, VP3, VP5 et VP7. Seule, cette dernière option a montré des résultats prometteurs (33). Cependant, il y a encore des éléments à déterminer telle que la durée de vie des anticorps neutralisants induits par les pseudo-particules, l'utilisation de différentes pseudo-particules pour différents sérotypes et les conditions de production à l'échelle industrielle selon des protocoles efficaces et à coûts raisonnables. La description suivante se réfère aux vaccins à virus vivants.

### 1. Gestion des semences virales

#### a) Caractéristiques de la semence virale

Le virus de semence, maître ou primaire, est préparé à partir d'une seule plage d'un virus BTV atténué, passé en série. Les lots secondaires de semence, qui sont utilisés comme inocula pour la production des vaccins n'ont généralement pas subi plus de 3 passages depuis la constitution du lot de semence primaire. Le virus de semence primaire ne doit pas être contaminé par des bactéries, des virus (en particulier, les pestivirus), des champignons et des mycoplasmes et doivent avoir la spécificité de sérotype nécessaire. Chaque lot de semence primaire doit avoir été analysé pour ce qui concerne la transmissibilité et la réversion vers la virulence avant le développement du vaccin. Les échantillons de vaccin préparés à partir

du virus de semence secondaire à son niveau de passage maximum doivent être testés sur moutons pour estimer l'absence de virulence, l'innocuité et l'immunogénicité.

**b) Méthode de culture**

Les premiers vaccins ont été produits sur embryon de poulets (2). Plus récemment, différents types de cellules ont été utilisés pour l'adaptation du virus et les passages en série. Ces cellules sont les cellules primaires embryonnaires bovines, les cellules de reins d'agneau ou de fœtus de mouton et les lignées BHK (cellules de reins de hamster nouveau-nés). Les cellules utilisées pour l'atténuation doivent être indemnes de virus contaminants. Les cellules ou lignées peuvent contenir des virus oncogènes mais les cellules primaires peuvent aussi être infectées par des virus latents ou inapparents tels que les pestivirus. Dans ce cas, une attention particulière doit être portée au sérum de bovin fœtal utilisé par les cellules et qui peut être contaminé. Les virus vaccinaux ont été atténués par passage en embryons de poulet, en cellules en culture ou les deux.

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

Les vaccins BT doivent être sûrs et efficaces et une brève description des essais appropriés pour étudier ces paramètres est donnée ci-dessous. De plus, les vaccins atténués ne doivent pas redevenir virulents pendant la réplication chez l'animal vacciné ou être transmis à partir de tels animaux à des insectes vecteurs. Ce dernier critère est très important parce que la transmission de virus atténués par des insectes à des animaux non-immuns induit le risque de réversion vers la virulence notamment par les étapes de réplication dans chaque espèce hôte. Bien que les tests pour étudier la réversion vers la virulence et la dissémination sont rares, voire non réalisés, une brève description de ce qui est nécessaire est donnée.

i) *Absence de virulence*

Des moutons, séronégatifs par ELISA de compétition (fièvre catarrhale ovine), sont inoculés avec le lot de semence primaire ou avec un volume identique de milieu de culture. Les températures corporelles sont notées 2 fois par jour. Les animaux sont contrôlés à intervalles réguliers sur une période de 28 jours concernant les signes cliniques et toutes réactions locales ou systémiques qui confirment l'absence de virulence et d'innocuité. Les échantillons de sang prélevés à intervalles réguliers peuvent être utilisés pour mesurer la virémie et les réponses en anticorps. Pour que le test soit considéré comme validé, il faut que la mise en évidence de la réplication de la souche vaccinale soit effectuée chez tous les moutons et que ceux-ci ne présentent aucun signe clinique autre qu'une légère altération de l'état de santé. En Afrique sud, un degré déterminé d'intensité des réactions cliniques (33) calculé pour chaque animal entre les jours 4 et 14 doit avoir une valeur inférieure à une cellule d'une valeur seuil standard.

ii) *Innocuité*

Les tests d'innocuité pour les vaccins atténués ne concernent pas le pouvoir tératogène (34). Les virus atténués sont tératogènes et ne doivent pas être administrés à des femelles gestantes pendant la première moitié de la gestation sous peine de causer des avortements et des anomalies fœtales (20).

iii) *Efficacité*

Des moutons vaccinés et non vaccinés sont éprouvés avec une souche virulente du même sérotype et les signes cliniques de BT sont surveillés. Les températures rectales sont prises 2 fois par jour. Les animaux non vaccinés doivent présenter des signes cliniques de BT. Cependant, il est difficile d'obtenir avec certitude l'apparition de signes cliniques après inoculation de mouton avec certains sérotypes et isolats du virus de la BT et par conséquent, le seul élément confirmant l'infection des animaux repose sur la mise en évidence d'une augmentation de la température corporelle de 1,7°C au moins par rapport à la moyenne des températures avant épreuve. Les sérums pré et post vaccination sont analysés pour détecter la présence d'anticorps neutralisants.

iv) *Transmissibilité*

Les protocoles pour déterminer si le virus atténué peut être transmis par des insectes qui se nourrissent à partir de moutons vaccinés et virémiques sont difficiles à réaliser et à analyser statistiquement et en conséquence, le critère de validation est rarement recherché. Des données de laboratoire indiquent que les souches virales adaptées en laboratoire peuvent être transmises par des insectes vecteurs (35). Un protocole adapté pour déterminer la transmissibilité de souche atténuée nécessite l'utilisation de moutons vaccinés qui pendant la phase virémique sont exposés à des culicoïdes non-infectés et compétents qui ensuite, seront mis en contact avec des moutons non infectés qui seront testés pour détecter le virus et les anticorps anti-virus de la BT. Compte tenu du fait que les titres des virus atténués dans le sang des moutons vaccinés sont faibles, un grand nombre de culicoïdes est nécessaire dont une faible proportion seulement s'infectera et vivront suffisamment longtemps pour prendre un repos sanguin et transmettre potentiellement le virus à des moutons non

infectés. Il est difficile de mettre œuvre une expérimentation qui tient compte du nombre élevé de moutons vaccinés et d'insectes qui seraient impliqués dans une situation réelle. Cependant, en Afrique du sud, la valeur minimale dans le sang d'un animal qui est retenue pour estimer qu'il y aura infection des culicoïdes lors du repas sanguin est de  $10^3$  bien qu'il ait été évoqué qu'un titre plus faible pourrait parfois être suffisant pour permettre l'infection. Pour sélectionner une souche virale suffisamment atténuée, le sang total est prélevé entre les jours 4 et 14 après vaccination et le titre viral est calculé. Seuls les virus atténués qui génèrent des titres inférieurs à  $10^3$  sont considérés comme acceptables.

Des données indiquent que pendant la phase virémique et contrairement aux souches sauvages, les souches adaptées en laboratoire peuvent être retrouvées dans la semence de taureaux et de béliers (32). Les conséquences de ces observations en terme de transmission ne sont pas claires.

v) *Réversion vers la virulence*

Des études de validation confirment que les virus atténués ne redeviennent pas virulents chez les moutons vaccinés. En conséquence, si les insectes ne transmettent pas les virus atténués des animaux vaccinés aux animaux non vaccinés, la réversion vers la virulence pendant les différents cycles de réplication chez les moutons et les insectes devient une réelle possibilité. La seule façon de contrôler la réversion vers la virulence dans ces conditions est de comparer la virulence des virus vaccinaux avec celle de ceux qui ont subi des passages moutons-insectes comme décrit ci-dessus. Ceci est difficile à réaliser. Par conséquent, les effets du nombre de passages moutons-insectes sur la virulence des virus atténués, n'ont pas été déterminés. En Afrique du sud, il est admis que si le sang d'animaux vaccinés, prélevés pendant les phases virémiques est passé en série 3 fois sur moutons sans réversion vers la virulence alors les risques de réversion sur le terrain sont extrêmement faibles.

## 2) Méthode de fabrication

L'atténuation des isolats de terrain du virus de la BT a d'abord été réalisée par des passages en série sur embryon de poulets. Plus récemment, il est apparu clairement que les passages en série sur des cellules en culture peuvent provoquer une atténuation de la virulence. Aucune étude n'a été réalisée pour déterminer le nombre exact de passages à effectuer et le degré d'atténuation obtenu pour des isolats individuels ou selon les sérotypes. Pour préparer des virus atténués, les isolats de terrain sont adaptés aux cellules en culture et sont passés 40 fois ou plus *in vitro*. Dans l'idéal, un certain nombre de virus sont clonés par la technique des plages à cette étape et chaque virus cloné est étudié pour déterminer le niveau de la virémie qu'il peut induire et sa capacité à entraîner une réponse immune chez les moutons vaccinés. Le virus qui convient le mieux est celui qui se réplique à bas titre mais induit une réponse protectrice et peut ainsi constituer le stock primaire de semence de la souche vaccinale.

## 3) Contrôles en cours de fabrication

Tous les composés d'origine animale, y compris le sérum et les cellules, doivent être analysés pour rechercher la présence de bactéries, virus, champignons et mycoplasmes.

## 4) Contrôle des lots

### a) Stérilité

Chaque lot de vaccin doit être testé pour rechercher la présence de bactéries, de virus contaminants, champignons ou mycoplasmes et en particulier des contaminations par les pestivirus. Par exemple, en Afrique du sud, un mélange de 10 ampoules choisies au hasard est inoculé à un bouillon de culture et à un bouillon de thioglycolate qui sont incubés à température ambiante et à 37°C respectivement pendant 14 jours. S'il est contaminé, le lot est retiré.

### b) Innocuité

L'innocuité de chaque lot est testée chez les souris adultes et nouveau-nés, les cobayes et les moutons. Si des effets délétères ou des manifestations cliniques sont notés, le test est répété. Toute augmentation de température chez l'animal cible qui est en dessus du seuil attendu pour une souche donnée d'un virus atténué est considéré comme un symptôme. Si les résultats sont non satisfaisants, le lot est retiré.

### c) Activité

Chaque lot est testé par inoculation à des moutons sensibles. Des sérums prélevés avant vaccination et 21 et 28 jours après vaccination sont testés par neutralisation virale pour déterminer le niveau d'anticorps neutralisants. Pour être validé, le titre en anticorps doit être égal ou supérieur à celui d'un sérum standard défini dans le cadre des standards internationaux de vaccins.

**d) Durée de l'immunité**

Les études effectuées sur les vaccins atténués montrent que les anticorps chez les moutons apparaissent moins de 10 jours après vaccination, atteignent leurs titres maximum 4 semaines plus tard et persistent pendant au moins 1 an. Il y a une relation entre l'augmentation des titres en anticorps neutralisants et la clairance du virus de la circulation périphérique. Les vaccins atténués contre le virus de la BT ont été utilisés depuis plus de 40 ans et sont réputés induire une immunité longue et efficace (13). La plupart des sérotypes sont présents dans des régions d'enzootie en Afrique du sud où des vaccins polyvalents sont utilisés. L'introduction de 15 sérotypes dans le vaccin indique qu'une réponse immune efficace n'est pas générée contre tous les sérotypes, probablement parce que la masse antigénique des antigènes spécifiques de sérotypes est faible. Afin d'améliorer la réponse immunitaire, la vaccination est répétée tous les ans (12).

**e) Stabilité**

La stabilité doit être testée sur une période de 2 ans. Les vaccins sous forme liquide ou lyophilisée sont réputés avoir une demi-vie de 1 et 2 ans respectivement. Chaque lot de vaccin est soumis à un test accéléré d'étude de la demi-vie à 37°C pendant 7 jours. Il est titré et évalué selon des standards et selon les analyses initiales du vaccin.

**f) Précautions d'emploi et mise en garde**

Le vaccin polyvalent est sûr sauf s'il est utilisé chez des brebis pendant la première partie de la gestation. Les agneaux ayant une immunité colostrale ne peuvent pas être vaccinés avant l'âge de 6 mois.

**5. Contrôles du produit fini**

**a) Innocuité**

voir C.4.b.

**b) Activité**

voir C.4.c.

## REMERCIEMENTS

Je souhaiterais remercier le Dr. Peter Mertens pour son aide épistolaire concernant la diagnostic par PCR, Dr Alchison pour m'avoir fourni des informations concernant la protection et le contrôle des vaccins contre la FCO en Afrique du sud, les Laboratoires Nationaux des Services Vétérinaires, Ames, Iowa, États-Unis d'Amérique pour avoir fourni des protocoles opératoires détaillés sur la PCR et tous les relecteurs des chapitres précédents publiés dans le *Manuel* de l'OIE de 2000.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AFSHAR A., THOMAS F.C., WRIGHT P.F., SHAPIRO J.L. & ANDERSON J. (1989). Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting bluetongue virus antibodies in cattle and sheep. *Vet. Rec.*, **124**, 136–141.
2. ALEXANDER R.A. & HAIG D.A. (1951). The use of egg attenuated bluetongue in the production of a polyvalent vaccine for sheep. A. Propagation of the virus in sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **25**, 3–15.
3. ANDERSON J. (1984). Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus. *J. Immunol. Methods*, **74**, 139–149.
4. BILLINIS C., KOUMBATI M., SPYROU V., NOMIKOU K., MANGANA O., PANAGIOTIDIS C.A. & PAPADOPOULOS O. (2001). Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription-PCR: a comparison with conventional methods. *J. Virol. Methods*, **98**, 77–89.
5. BLACKSELL S.D. & LUNT R.A. (1996). A simplified fluorescence inhibition test for the serotype determination of Australian bluetongue viruses. *Aust. Vet. J.*, **73**, 33–34.

6. CALISTRI P., GOFFREDO M., CAPORALE V. & MEISWINKEL R. (2003). The distribution of *Culicoides imicola* in Italy. Application and evaluation of current Mediterranean models based on climate. *J. Vet. Med. B.*, **40**, 132–138.
7. BOULANGER P. & FRAND F.J. (1975). Serological methods in the diagnosis of bluetongue. *Aust. Vet. J.*, **51**, 185–189.
8. CLAVIJO A., HECKERT R.A., DULAC G.C. & AFSHAR A. (2000). Isolation and identification of bluetongue virus. *J. Virol. Methods*, **87**, 13–23.
9. DANGLER C.A., DE MATTOS C.A., DE MATTOS C.C. & OSBURN B.I. (1990). Identifying bluetongue virus ribonucleic acid sequences by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **28**, 281–292.
10. EDINGTON A. (1900). South African horse-sickness: its pathology and methods of protective inoculation. *J. Comp. Pathol. Therap.*, **13**, 200–231.
11. ERASMUS B.J. (1975). Bluetongue in sheep and goats. *Aust. Vet. J.*, **51**, 165–170.
12. ERASMUS B.J. (1975). The control of bluetongue in an enzootic situation. *Aust. Vet. J.*, **51**, 209–210.
13. ERASMUS B.J. (1990). Bluetongue virus. *In: Virus Infections of Ruminants*, Dinter Z. & Morein B., eds. Elsevier, New York, USA, 227–237.
14. GARD G.P. & KIRKLAND P.D. (1993). Bluetongue virology and serology. *In: Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases*, Corner L.A. & Bagust T.J., eds. CSIRO Information Services, P.O. Box 89, East Melbourne, Victoria 3002, Australia.
15. GHALIB H.W., CHERRINGTON J.M. & OSBURN B.I. (1984). Virological, clinical and serological responses of sheep infected with tissue culture adapted bluetongue virus serotypes 10, 11, 13 and 17. *Vet. Microbiol.*, **10**, 179–188.
16. GOUET P., DIPROSE J.M., GRIMES J.M., MALBY R., BURROUGHS J.N., ZIENTARA S., STUART D.I. & MERTENS P.P. (1999). The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography. *Cell*, **97**, 481–490.
17. GOULD A.R. (1987). The complete nucleotide sequence of bluetongue virus serotype 1 RNA3 and a comparison with other geographic serotypes from Australia, South Africa and the United States of America, and with other orbivirus isolates. *Virus Res.*, **7**, 169–183.
18. HAWKES R.A., KIRKLAND P.D., SANDERS D.A., ZHANG F., LI Z., DAVIS R.J. & ZHANG N. (2000). Laboratory and field studies of an antigen capture ELISA for bluetongue virus. *J. Virol. Methods*, **85**, 137–149.
19. JOHNSON D.J., WILSON W.C. & PAUL P.S. (2000). Validation of a reverse transcriptase multiplex PCR test for the serotype determination of U.S. isolates of bluetongue virus. *Vet. Microbiol.*, **76**, 105–115.
20. JOHNSON S.J., POLKINGHORNE I.G., FLANAGAN M., & TOWNSEND W.L. (1992). The Australian experience: results of a bluetongue vaccination program. *In: Bluetongue, African Horsesickness and Related Orbiviruses*, Walton T.E. & Osburn B., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 868–873.
21. LELLI R., PORTANTI O., LANGELLA V., LUCIANI M., DI EMIDIO B. & CONTE A.M. (2003). Production of a competitive ELISA kit for the serological diagnosis of bluetongue disease. *Veterinaria Italiana*, **39**, 47.
22. LUNT R.A., WHITE J.R. & BLACKSELL S.D. (1988). Evaluation of a monoclonal antibody blocking ELISA for the detection of group-specific antibodies to bluetongue virus in experimental and field sera. *J. Gen. Virol.*, **69**, 2729–2740.
23. MACLACHLAN N.J., NUNAMAKER R.A., KATZ J.B., SAWYER M.M., AKITA G.Y., OSBURN B.I. & TABERCHNICK W.J. (1994). Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay, and in vitro feeding of *Culicoides variipennis*. *Arch. Virol.*, **136**, 1–8.

24. MARTINEZ-TORRECUADRADA J.L., LANGEVELD J.P., VENDEO A., SANZ A., DALSGAARD K., HAMILTON W.D., MELOEN R.H. & CASAL J.I. (1999). Antigenic profile of African horse sickness virus serotype 4 VP5 and identification of a neutralizing epitope shared with bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus. *Virology*, **257**, 449–459.
25. MARTYN C.J., GOULD A.R. & EATON B.T. (1990). High level expression of the major core protein VP7 and the non-structural protein NS3 of bluetongue virus in yeast: use of expressed VP7 as a diagnostic, group-reactive antigen in a blocking ELISA. *Virus Res.*, **18**, 165–178.
26. MCCOLL K.A. & GOULD A.R. (1991). Detection and characterisation of bluetongue virus using the polymerase chain reaction. *Virus Res.*, **21**, 19–34.
27. MECHAM J.O., DEAN V.C., WIGINGTON J.G. & NUNAMAKER R.A. (1990). Detection of bluetongue virus in *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) by an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Med. Entomol.*, **27**, 602–606.
28. NARESH A. & PRASAD G. (1995). Relative superiority of c-ELISA for detection of bluetongue virus antibodies. *Indian J. Exp. Biol.*, **33**, 880–882.
29. OLDFIELD S., ADACHI A., URAKAWA T., HIRASAWA T. & ROY P. (1990). Purification and characterization of the major group-specific core antigen VP7 of bluetongue virus synthesized by a recombinant baculovirus. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2649–2656.
30. PRITCHARD L.I., GOULD A.R., WILSON W.C., THOMPSON L., MERTENS P.P. & WADE-EVANS A.M. (1995). Complete nucleotide sequence of RNA segment 3 of bluetongue virus serotype 2 (Ona-A). Phylogenetic analyses reveal the probable origin and relationship with other orbiviruses. *Virus Res.*, **35**, 247–261.
31. REDDINGTON J.J., REDDINGTON G.M. & MACLACHLAN N.J. (1991). A competitive ELISA for detection of antibodies to the group antigen of bluetongue virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **3**, 144–147.
32. ROBERTS D.H., LUCUS M.H. & BELL R.A. (1992). Animal and animal product importation and assessment of risk. In: *Bluetongue, African Horsesickness and Related Orbiviruses*, Walton T.E. & Osburn B.I., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 916–923.
33. ROY P., BISHOP D.H.L., LEBLOIS H. & ERASMUS B.J. (1994). Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine*, **12**, 805–811.
34. SHULTZ G. & DELAY P.D. (1955). Losses in newborn lambs associated with bluetongue vaccination of pregnant ewes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **128**, 224–226.
35. STANDFAST H.A., DYCE A.L. & MULLER M.J. (1985). Vectors of BT in Australia. In: *Bluetongue and Related Orbiviruses*, Barber T.L. & Jochim M.M., eds. Alan R. Liss, New York, USA, 177–186.
36. THOMAS F.C. (1984). Comparison of some storage and isolation methods to recover bluetongue virus from bovine blood. *Can. J. Comp. Med.*, **48**, 108–110.
37. WADE-EVANS A.M., MERTENS P.P.C. & BOSTOCK C.J. (1990). Development of the polymerase chain reaction for the detection of bluetongue virus in tissue samples. *J. Virol. Methods*, **30**, 15–24.
38. WILSON W.C., MA, H.C., VENTER E.H., VAN DJIK A.A., SEAL B.S. & MECHAM J.O. (2000). Phylogenetic relationships of bluetongue viruses based on gene S7. *Virus Res.*, **67**, 141–151.
39. XU G., WILSON W., MECHAM J., MURPHY K., ZHOU E.M. & TABACHNICK W. (1997). VP7: an attachment protein of bluetongue virus for cellular receptors in *Culicoides variipennis*. *J. Gen. Virol.*, **78**, 1617–1623.

\*

\* \*

**NB** : Il existe des Laboratoires de référence de l'OIE pour la Fièvre catarrhale du mouton (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : [www.oie.int](http://www.oie.int)).