

DERMATOSE NODULAIRE CONTAGIEUSE

RÉSUMÉ

La dermatose nodulaire contagieuse (DNC) est une maladie virale du bétail due à un poxvirus et caractérisée par de la fièvre, l'apparition de volumineux nodules sur la peau, les muqueuses et les organes internes, de l'anémie, une hypertrophie des noeuds lymphatiques et de l'œdème cutané, spécialement dans les parties déclives. Elle peut entraîner la mort. Son importance économique est due aux pertes de production qu'elle occasionne, en particulier dans les troupeaux laitiers. Elle cause également des dommages importants aux cuirs. La DNC est causée par diverses souches de Capripoxvirus indistinctes au plan antigénique des souches responsables de la variole ovine et de la variole caprine. Cependant, la distribution géographique des deux affections est différente, ce qui suggère que les souches bovines de Capripoxvirus ne peuvent infecter ni se transmettre au mouton ou à la chèvre. La transmission du virus s'effectue essentiellement par des insectes, la contamination par contact direct en l'absence d'insectes n'ayant pas été observée. Jusqu'à 1988, la DNC était confinée aux régions sub-sahariennes ainsi qu'à l'Égypte. Toutefois, deux foyers de cette maladie, confirmés par le laboratoire, ont été observés : l'un, en Israël en 1989, où il a été éliminé par abattage de tous les animaux infectés, malades et contaminés, et par des mesures de vaccination et l'autre à la Réunion en 1993. Un foyer a été rapporté également à Bahreïn la même année, mais il n'a pas été confirmé par l'isolement du virus. En 2000, un foyer est apparu sur des bovins importés dans l'île Maurice ; le diagnostic a été confirmé par microscopie électronique.

Identification de l'agent pathogène : le moyen le plus rapide de confirmation de la maladie chez les bovins est la mise en évidence au laboratoire des particules virales du Capripoxvirus soit dans les biopsies, soit dans les croûtes lésionnelles par examen en microscopie électronique directe après coloration négative, ce dans le cas d'une affection nodulaire cutanée généralisée accompagnée d'une hypertrophie des nœuds lymphatiques superficiels. Le Capripoxvirus responsable de la DNC est différent des parapoxvirus agents de la stomatite papuleuse bovine et de la pseudo-cowpox, mais il ne peut pas être différencié au plan morphologique des virus de la vaccine et de la variole bovine, toutes deux des infections du bétail causées par des orthopoxvirus. Aucune de ces dernières n'est cependant à l'origine d'infections généralisées chez les bovins. En outre, elles sont relativement peu fréquentes. Le virus de la DNC se multiplie dans des cultures de tissus d'origine bovine, ovine ou caprine, son titre maximum étant atteint sur cellules de testicule d'agneau. Il engendre un effet cytopathogène (ECP) caractéristique avec présence de corps d'inclusion intracytoplasmiques, distinct de celui du virus de la pseudo-dermatose nodulaire contagieuse (thélite ulcérate herpétique ou maladie d'Allerton), due à un herpèsvirus produisant des syncytiums et des corps d'inclusion intranucléaires. Les antigènes du Capripoxvirus peuvent être mis en évidence en culture de tissu par les techniques d'immunoperoxydase ou par immunofluorescence, et le virus peut être neutralisé par des anticorps spécifiques.

La détection de l'antigène par une méthode immuno-enzymatique (ELISA) a été mise au point en utilisant un sérum polyclonal produit à partir d'un antigène de Capripoxvirus immunodominant recombinant. La détection du génome a pu être également réalisée en utilisant des amorces spécifiques pour les gènes codant les protéines de fusion et les protéines d'attachement et une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisable tant sur des échantillons de tissu que sur le sang été décrite.

Épreuves sérologiques : l'épreuve sérologique la plus spécifique est la séroneutralisation virale ; mais, comme l'immunité vis-à-vis de l'infection est à prédominance cellulaire, cette épreuve n'est pas suffisamment sensible pour identifier les animaux qui ont été en contact avec le virus et qui ont développé des anticorps neutralisants à des titres peu élevés. L'épreuve d'immunodiffusion en

gélose et l'épreuve d'immunofluorescence indirecte sont moins spécifiques du fait des réactions croisées avec d'autres poxvirus. Le western blot faisant appel à la réaction entre l'antigène P32 du virus et les sérums à tester est à la fois spécifique et sensible mais il est coûteux et difficile à mettre en œuvre. L'utilisation de cet antigène, exprimé par un vecteur approprié, dans un ELISA offre la perspective d'un test sérologique acceptable et normalisé.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *toutes les souches de capripoxvirus examinées jusqu'à présent, qu'elles soient issues de bovins, de moutons ou de chèvres, ont des antigènes immunisants communs. Des souches atténuées issues de bovins ou de souches isolées de mouton ou de chèvre ont été utilisées comme vaccins à virus vivant.*

A. INTRODUCTION

La dermatose nodulaire contagieuse (DNC) a été isolée pour la première fois en Zambie en 1929, s'étendant au Botswana en 1943 (16) puis en Afrique du Sud où elle affecta plus de 8 millions de bovins, occasionnant d'énormes pertes économiques. En 1957, elle fit son apparition au Kenya, associée à la variole ovine (28). En 1970, elle diffusa dans le Nord du Soudan ; en 1974, elle s'étendit à l'ouest jusqu'au Nigeria et, en 1977, atteignit la Mauritanie, le Mali, le Ghana et le Libéria. D'autres épizooties de DNC affectèrent, entre 1981 et 1986, la Tanzanie, le Kenya, le Zimbabwe, la Somalie et le Cameroun occasionnant la mortalité de 20 % des animaux infectés. Cependant, l'étendue véritable de l'épizootie reste mal connue et il est vraisemblable qu'elle affecte une grande partie du centre de l'Afrique. En 2000/2001, une autre grande épizootie s'est répandue dans toute l'Afrique sub-saharienne (11). En 1988, elle était bien installée en Égypte, et, en 1989, la présence d'un foyer était rapportée en Israël. La DNC doit être considérée comme une maladie pouvant s'étendre hors d'Afrique. Son principal mode de transmission est mécanique, en particulier par les piqûres d'arthropodes vecteurs (6, 9).

La sévérité des signes cliniques de la DNC est fonction de la souche de capripoxvirus en cause et de l'espèce affectée. *Bos taurus* est plus sensible à la maladie que *Bos indicus*. Le buffle asiatique peut également être atteint par la maladie. La race peut aussi revêtir une certaine importance car les lignées à peau fine Channel Island développent une maladie plus sévère, les vaches en lactation étant les plus sensibles au virus. Cependant, de grandes variations cliniques peuvent être observées au sein même d'un groupe d'animaux élevés ensemble dans des conditions similaires, depuis l'infection inapparente jusqu'à la mort (7). Au sein d'un troupeau, certains animaux peuvent très bien ne pas être infectés si la prévalence vectorielle est faible.

Dans le cas d'une infection aiguë, on observe une hyperthermie initiale qui peut dépasser 41 °C et persister durant 1 semaine. La durée de l'incubation, dans les conditions naturelles, n'a pas été rapportée, mais le pic thermique débute 6 à 9 jours après l'inoculation expérimentale. Une rhinite et de la conjonctivite apparaissent et, chez les vaches en lactation, la sécrétion lactée diminue. Des nodules de 2 à 5 mm de diamètre se développent sur le corps, en particulier sur la tête, l'encolure, la mamelle et le périnée entre 7 et 19 jours après l'inoculation (11). Ces nodules envahissent le derme et l'épiderme, et peuvent au début laisser exsuder un peu de sérosité mais, au cours des 2 semaines suivantes, ils se nécrosent et forment des ulcères dans toute l'épaisseur de la peau. Tous les ganglions lymphatiques superficiels sont hypertrophiés, les membres peuvent être le siège d'œdèmes importants et l'animal a du mal à se déplacer. Les nodules localisés sur les muqueuses des yeux, du mufle, de la bouche, du rectum et des organes génitaux, ainsi que sur la peau de la mamelle s'ulcèrent rapidement et toutes les sécrétions sont virulentes. Suivant la gravité des signes cliniques, les excréments oculo-nasaux deviennent muco-purulents, et une kératite peut se développer. Les nodules peuvent aussi apparaître dans la bouche, le tissu sous-cutané et les muscles, la trachée et le tube digestif, en particulier dans le rumen et les poumons, occasionnant une pneumonie primaire et secondaire. Les animaux en gestation peuvent avorter et certaines publications font état de foetus couverts de nodules. Les taureaux peuvent devenir temporairement ou définitivement stériles et le virus peut être excrété longtemps dans le sperme (18). La guérison d'une infection sévère est lente : l'animal est émacié ; il peut subsister une pneumonie et une métrite ; les lésions nécrotiques « clouteuses » de la peau, qui peuvent être aggravées par des attaques d'insectes, laissent de profondes cicatrices dans le tissu cutané (23).

La dermatose nodulaire contagieuse n'est pas transmissible à l'homme.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

• Collecte et préparation de l'échantillon

Le matériel pour la préparation et l'isolement de l'antigène doit être récolté par biopsie ou, sur un animal mort, par prélèvement de nodules cutanés, de lésions pulmonaires ou de noeuds lymphatiques. Les échantillons destinés à l'isolement du virus et à la mise en évidence de l'antigène par une méthode immuno-enzymatique (ELISA) doivent être récoltés au cours de la première semaine suivant l'apparition des signes cliniques, avant l'apparition des anticorps neutralisants (12, 13). Les échantillons destinés à la détection du génome viral par une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) peuvent être récoltés quand les anticorps sont apparus. Dès l'apparition des lésions cutanées, le virus peut être isolé jusqu'à 35 jours après et l'acide nucléique peut être mis en évidence par PCR jusqu'à 3 mois après (26, 27). La fraction leucocytaire (« buffy coat ») récoltée à partir de sang hépariné ou additionné d'EDTA (acide éthylène-diamine-tétra-acétique) au cours du stade virémique de la maladie (avant la généralisation des lésions ou dans les 4 jours qui suivent) peut aussi être utilisée pour l'isolement viral. Les échantillons destinés à l'histologie doivent inclure les marges de la lésion et être placés immédiatement après leur prélèvement dans un flacon contenant un volume de formol à 10 % équivalent à 10 fois celui de la lésion.

Les tissus conservés dans du formol ne nécessitent pas de précautions particulières pour leur transport. Les prélèvements sanguins sur anticoagulant destinés à l'isolement du virus à partir de la fraction leucocytaire doivent être placés immédiatement dans de la glace et traités aussi vite que possible. Dans la pratique, ils peuvent être conservés à 4 °C pendant plus de 2 jours avant leur traitement, mais ils ne doivent en aucun cas être congelés ou maintenus à température ambiante. Les tissus destinés à l'isolement du virus ou à la détection de l'antigène doivent être conservés à 4 °C dans la glace ou à -20 °C. Si le transport des prélèvements ne peut être effectué sur de longues distances sous froid, le milieu de transport devra contenir 10 % de glycérol ; la taille des échantillons devra alors être suffisante pour que le milieu de transport ne pénètre pas au cœur du prélèvement qui servira à l'isolement viral.

Le matériel destiné à l'histologie devra être préparé suivant les techniques usuelles et colorées à l'hématoxyline-éosine (HE) (2). Les prélèvements destinés à l'isolement du virus et de l'antigène sont dissociés à l'aide de ciseaux et de pinces stériles, broyés au mortier avec du sable stérile et un volume équivalent de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) additionné de pénicilline sodée (1 000 Unités Internationales [UI]/ml), de sulfate de streptomycine (1 mg/ml), de mycostatine (100 UI/ml) ou de fongizone (2,5 µg/ml) et de néomycine (200 UI/ml). La suspension est congelée-décongelée 3 fois de suite puis partiellement clarifiée par centrifugation à 600 *g* pendant 10 min. La fraction leucocytaire peut être recueillie à partir du sang hépariné par centrifugation à 600 *g* pendant 15 min et remise précautionneusement en suspension dans 5 ml d'eau bidistillée réfrigérée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Après un temps de latence de 30 s, on rajoute à cette suspension 5 ml de milieu de croissance réfrigéré concentré 2 fois. Le mélange est alors centrifugé à 600 *g* pendant 15 min ; le surnageant est éliminé et le culot cellulaire suspendu dans un milieu de croissance comme le milieu de Eagle modifié par Glasgow (GMEM). Après centrifugation à 600 *g* pendant 15 min, le culot est recueilli et à nouveau suspendu dans 5 ml de GMEM frais. Une technique alternative consiste à séparer la fraction leucocytaire de l'échantillon de sang hépariné par utilisation d'un gradient Ficoll.

a) Culture

Le virus de la DNC est apte à se multiplier dans des tissus d'origine bovine, ovine ou caprine en culture, bien que les cultures de cellules de première ou seconde explantation de testicule d'agneau soient considérées comme les plus sensibles, particulièrement celles issues d'une lignée de moutons à laine. Les échantillons de prélèvement préparés comme ci-dessus, par exemple 1 ml de surnageant de broyat cellulaire ou de plasma clarifié, sont inoculés à des cultures de cellules en boîtes de 25 cm² puis placés pour adsorption à 37 °C pendant 1 h. La culture est ensuite lavée avec du tampon PBS chaud (37 °C) et recouverte de 10 ml d'un milieu adéquat tel que le GMEM additionné d'antibiotiques et de 2 % de sérum de veau foetal. On pourra aussi, les inoculer à des tubes dits de tubes de Leighton contenant des lamelles de verre sur lesquelles on aura au préalable fait pousser des cellules sensibles, si l'on en dispose.

Les flacons seront examinés quotidiennement pendant 14 jours pour rechercher un éventuel effet cytopathogène (ECP) sur les cultures et le milieu sera changé lorsqu'il deviendra trouble. Les cellules infectées développent un ECP caractéristique se manifestant par la rétraction de la membrane, éventuellement par l'arrondissement des cellules et la margination de la chromatine nucléaire. Au début, seules pourront être observées quelques petites zones d'ECP, parfois dès le 2^e jour suivant l'infection ; dans les 4 à 6 jours qui suivent, l'ECP s'étend à la totalité du tapis. S'il n'est pas décelable au 14^e jour, la culture devra subir 3 congélations-décongelations successives, puis être clarifiée par centrifugation, et le surnageant sera repris et inoculé à de nouvelles cultures de cellules de testicule d'agneau. Au premier signe d'ECP ou dès les premiers signes de dégénérescence cellulaire affectant les cultures sur lamelles de verre,

celles-ci doivent être retirées des tubes, fixées à l'acétone (à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) et colorées par l'hématoxyline-éosine. Le diagnostic de l'infection par un poxvirus se fait par la mise en évidence dans le cytoplasme de corps d'inclusion éosinophiles, de taille variable mais supérieure à la moitié de celle du noyau et entourés par un halo clair. L'ECP peut être éliminé ou atténué par l'adjonction au milieu de culture d'un sérum spécifique anti-dermatose nodulaire contagieuse. L'herpès-virus de la pseudo dermatose nodulaire contagieuse (Maladie d'Allerton) produit des corps d'inclusion intranucléaires de type A de Cowdry. La formation de syncytiums n'est pas caractéristique de l'infection par un capripoxvirus, à la différence de l'herpèsvirus responsable de la pseudo-dermatose nodulaire contagieuse.

Les souches de capripoxvirus responsables de la DNC ont été adaptées à la culture sur membrane chorio-allantoïdienne d'œuf embryonné de poule ainsi qu'aux cellules rénales en lignée continue de singe vert africain (Vero).

- **Microscopie électronique**

Avant d'effectuer les opérations de centrifugation, le matériel issu de la biopsie originale et en suspension dans du PBS, est traité en vue de son examen en microscopie électronique à transmission. Une gouttelette de cette suspension est déposée sur une grille de microscopie électronique de 400 mesh hexagonales, préalablement recouverte d'un film de nitrocellulose renforcé par des projections de carbone en vapeur de pentylamine. Au bout de 1 min, la grille est transférée à l'aide de pinces spéciales dans une goutte de tampon Tris/EDTA à pH 7,8 durant 20 s puis dans une goutte d'acide phosphotungstique à 1 % et à pH 7,2 pendant 10 s. Le surplus de suspension est éliminé par adsorption sur un morceau de papier filtre, puis la grille est séchée par agitation à l'air et placée dans le réceptacle porte-grille du microscope électronique. Le capripoxvirus a la forme d'une « brique » recouverte de courts éléments tubulaires entrecroisés qui mesurent approximativement $290 \times 270\text{ nm}$. Une membrane dérivée de la cellule-hôte peut englober certains virions et il faudra autant que possible effectuer plusieurs examens pour confirmer le diagnostic (21).

Les capripox virus ne peuvent être morphologiquement différenciés des orthopoxvirus mais, mis à part les virus de la vaccine et de la variole qui sont tous les deux rares chez le bétail et ne causent pas d'infection généralisée, aucun autre orthopoxvirus ne cause de lésions chez les bovins. Cependant, le virus de la vaccine peut être à l'origine d'une infection généralisée chez les jeunes veaux immunodéprimés. À l'inverse, les orthopoxvirus sont communément la cause d'affections cutanées chez le buffle, en particulier celui de la variole du buffle, maladie qui se manifeste habituellement par la présence de lésions nodulaires sur les trayons mais qui peut causer des lésions en d'autres sites tels que le périnée, la partie médiane des épaules et la tête. L'orthopoxvirus à l'origine de la variole du buffle ne peut pas être facilement distingué en microscopie électronique des capripoxvirus. Les parapoxvirus à l'origine de la stomatite papuleuse et de la pseudo-variole sont plus petits, de forme ovale et recouverts par un simple élément tubulaire continu qui donne l'aspect de striation que l'on observe à la surface du virion. Le capripoxvirus est également différent de l'herpèsvirus responsable de la pseudo-dermatose nodulaire contagieuse (maladie d'Allerton).

b) Méthodes immunologiques

- **Épreuves d'immunofluorescence**

L'antigène du capripoxvirus peut aussi être identifié par immunofluorescence sur cultures infectées des lamelles de verre des tubes de Leighton. Ces lamelles ou lames couvre-objet peuvent être lavées au PBS, séchées à l'air et fixées dans l'acétone à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 10 min. L'épreuve indirecte faisant appel à un immune-sérum bovin est sujet à de trop grandes variations de la couleur de fond et à l'origine de réactions non spécifiques. Cependant, un conjugué direct peut être préparé à partir de sérums de bovins convalescents (ou de moutons ou chèvres convalescents de variole caprine) ou, encore, de lapins hyperimmunisés avec du capripoxvirus purifié. Des cultures de cellules non infectées doivent être utilisées comme témoins négatifs en raison des réactions croisées provoquées par les anticorps du sérum rajouté à la culture cellulaire et qui peuvent poser des problèmes.

- **Épreuves d'immunodiffusion en gélose**

Une épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) a été utilisée pour détecter les antigènes précipitants du capripoxvirus mais le désavantage de cette technique est que cet antigène partage une partie commune avec les parapoxvirus. De l'agarose à 1 % est préparé en tampon borate à pH 8,6, dissous par chauffage et 2 ml est déposé sur une lame de verre de microscope ($76 \times 26\text{ mm}$). Lorsque l'agar est solidifié, 6 puits sont découpés en rosette autour d'un puits central. Chaque puits, d'un diamètre de 5 mm, est placé à 7 mm de distance du milieu du puits central et du milieu de chacun des puits périphériques voisins. Ces puits sont remplis de la façon suivante : 18 μl de la suspension préparée à partir de la lésion sont placés dans trois des puits périphériques, en alternance avec la suspension d'antigène positif servant de contrôle, et 18 μl de sérum positif anti-capripoxvirus témoin sont déposés dans le puits central. Les lamelles sont placées dans une chambre humide à la température du laboratoire pendant 48 h puis examinées par transparence à l'aide

d'une boîte lumineuse afin de visualiser les lignes de précipitation. L'échantillon est positif si une ligne de précipitation confluyente se développe entre le sérum témoin et l'antigène positif témoin.

L'antigène destiné aux réactions d'immunodiffusion en gélose est préparé de la manière suivante : 1 ou 2 flacons de culture cellulaire de TA de 125 cm² sont inoculés avec du capripoxvirus et congelés-décongelés 2 fois lorsque l'ECP atteint 90 % (8 à 12 jours). Les cellules infectées cultivées dans leur milieu sont décollées de leur support par agitation puis centrifugées à 4 000 *g* pendant 15 min. La majeure partie du surnageant est recueillie et conservée sous régime du froid, et le culot est remis en suspension dans le reste du surnageant. Les cellules doivent ensuite être lysées par action des ultrasons pendant 60 s environ. La préparation homogène obtenue est centrifugée comme précédemment, et le surnageant est dès lors aliquoté après avoir été additionné d'un volume équivalent de sulfate d'ammonium saturé à pH 7,4. Après avoir été maintenue pendant 1 h à 4 °C, la suspension est centrifugée à 4 000 *g* pendant 15 min, et le culot recueilli est à nouveau suspendu dans un petit volume de solution saline à 0,8 % en attendant son utilisation dans la réaction d'immunodiffusion. Les cultures non infectées subissent un traitement analogue pour produire un antigène tissulaire témoin (20).

- **Méthode immuno-enzymatique**

Suite au clonage de la protéine structurale P32 hautement antigénique du capripoxvirus, il est possible d'utiliser l'antigène recombinant exprimé pour la production de réactifs de diagnostic, entre autres un antisérum polyclonal spécifique de la protéine P32, et la production d'anticorps monoclonaux. Ces réactifs ont facilité le développement d'un ELISA hautement spécifique (5). En utilisant un antisérum de lapin obtenu par inoculation de lapins avec du capripoxvirus purifié, de l'antigène de capripox peut être mis en évidence sur une plaque ELISA dans des extraits de biopsies ou du surnageant de cultures cellulaires infectées. La présence de l'antigène peut également être démontrée en utilisant un sérum de cobaye préparé contre une protéine structurale P32 spécifique de groupe, une préparation commerciale d'immunoglobuline de lapin anti-cobaye conjuguée à la peroxydase de radis et une solution substrat/chromogène.

c) **Méthodes de reconnaissance de l'acide nucléique**

La PCR est une technique rapide et sensible pour la détection du génome des capripoxvirus dans du sang additionné d'EDTA, dans des biopsies ou des cultures de tissu. Cependant, elle ne permet pas la différenciation entre les virus de la DNC, de la clavelée ou de la variole caprine. Les amorces pour les gènes de la protéine d'attachement et de la protéine de fusion (17) sont spécifiques pour toutes les souches du genre *Capripoxvirus*. Par l'étude des séquences ou de la phylogénétique, les souches de virus peuvent être identifiées ; ce travail doit être conduit dans des laboratoires de référence. Les différentes souches de virus peuvent aussi être caractérisées par comparaison de leurs fragments de génome obtenus par la digestion enzymatique de leur ADN purifié par Hind III (1, 3, 19). Cette technique a permis de mettre en évidence des différences entre les isolats issus des différentes espèces mais ces différences ne sont pas conséquentes ; en outre, il a été montré des échanges de souches entre les espèces et même la recombinaison entre souches du terrain (14, 15).

Le génome du virus de la DNC comporte vraisemblablement 156 gènes (25). Un exemple de protocole publié pour une PCR est décrite ci-dessous (26).

- **Réaction d'amplification en chaîne par polymérase**

- **Protocole**

- i) Congeler et décongeler 200 µl de sang additionné d'EDTA et le suspendre dans 1000 µl de tampon de lyse.
- ii) Découper les échantillons de peau ou d'autres tissu en petits morceaux avec des ciseaux et des pinces stériles ou des lames de scalpel à usage unique. Broyer dans un mortier avec un pilon. Suspendre l'échantillon dans 1000 µl de tampon de lyse [tampon de lyse : 60 g de thiocyanate de guanidine ; 0,378 g de chlorure de potassium (KCl) ; 1 ml de Tris (1 M, pH 8) et 0,5 ml de Tween 20 dans 100 ml d'eau exempte de nucléase].
- iii) Ajouter 1 µl de protéinase K (20 mg/ml, Invitrogen) dans les échantillons de sang et 10 µl de protéinase K dans les échantillons de tissu. Incuber dans un four à 56 °C pendant 2 h, puis chauffer à 100 °C pendant 10 min, afin d'inactiver les enzymes. Ajouter 300 µl d'un mélange de phénol/chloroforme/alcool isoamyl (25:24:1) dans les échantillons de sang et 1000 µl dans les échantillons de tissu. Passer au vortex et incuber à température ambiante pendant 10 min. Centrifuger les échantillons à 10 000 *g* pendant 15 min à 4 °C. Récupérer soigneusement la phase aqueuse supérieure et transférer dans un tube propre de 2 ml. Ajouter deux volumes d'éthanol glacé (100 %). Placer les échantillons à -20 °C pendant 1 h afin de précipiter l'ADN. Centrifuger de nouveau à 10 000 *g* pendant 15 min à 4 °C et éliminer le surnageant. Laver les culots avec de l'éthanol à 70 %

(100 µl) et centrifuger à 10 000 *g* pendant 1 min à 4 °C. Éliminer le surnageant et sécher soigneusement les culots. Suspendre les culots dans 30 µl d'eau exempte de nucléase (26).

- iv) Les amorces mises au point à partir du gène codant la protéine d'attachement sont décrites par Ireland & Binopal (1998). La taille de l'amplicon est de 192 pb. Les amorces ont les séquences suivantes:

Amorce de tête : 5'-TTT-CCT-GAT-TTT-TCT-TAC-TAT-3'

Amorce de queue : 5'-AAA-TTA-TAT-ACG-TAA-ATA-AC-3'.

- v) L'amplification de l'ADN est réalisée sous un volume final de 50 µl contenant : 5 µl de tampon PCR concentré 10 fois, 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl d'amorce de tête, 1 µl d'amorce de queue, 1 µl de matrice ADN, 0,5 µl de *Taq* polymérase et 39 µl d'eau exempte de nucléase. Le volume de la matrice ADN nécessaire peut varier et le volume d'eau exempte d'eau doit être ajusté pour un volume final de 50 µl.
- vi) Incuber les échantillons dans le thermo-cycleur : premier cycle : 2 min à 95 °C (étape initiale de dénaturation), deuxième cycle : 45 s à 95 °C, 50 s à 50 °C et 1 min à 72 °C. Répéter le deuxième cycle 34 fois. Dernier cycle : 2 min à 72 °C (étape finale d'élongation) et conserver à 4 °C jusqu'à analyse.
- vii) Mélanger 10 µl de chaque échantillon avec une solution de coloration et placer sur un gel d'agarose à 1,5 % dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA). Sur une ligne parallèle, placer un marqueur ADN pour 100 pb. Séparer les produits à 80 V pendant 30 à 40 min et visualiser.

2. Épreuves sérologiques

Tous les virus du genre Capripoxvirus ont en commun un antigène majeur pour les anticorps neutralisants et il n'est donc pas possible de distinguer les souches de capripoxvirus de bovins, d'ovins et de caprins sur la base des techniques sérologiques.

a) Séroneutralisation du virus

Un sérum à tester peut être titré vis-à-vis d'un titre constant (100 DICT₅₀ [Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) du capripoxvirus, ou bien une souche de référence de virus peut être titrée vis-à-vis d'une dilution constante de sérum de référence, ce dans le but de calculer un index de neutralisation. Du fait des variations de sensibilité des cultures tissulaires au capripoxvirus et des difficultés conséquentes d'obtention de 100 DICT₅₀, la méthode de choix reste l'index de neutralisation. La description de cette épreuve fait appel à l'utilisation de micro-plaques de titrage à 96 puits à fond plat pour culture cellulaire mais on peut aussi bien employer des tubes de culture en utilisant le volume de milieu de culture approprié, bien qu'il soit plus difficile de déterminer un titre précis en tube. L'utilisation de cellules Vero dans ce type d'épreuve de neutralisation donnerait de meilleurs résultats.

• Protocole

- i) Les sérums à tester incluant un sérum témoin positif et un négatif sont dilués au 1/5 dans du milieu HEPES de Eagle (N-2-hydroxyethylpipérazine, N-2-acide sulfonique-éthane) puis inactivés à 56 °C pendant 30 min.
- ii) 50 µl de sérum préalablement inactivé sont ensuite additionnés au contenu des cupules des colonnes 1 et 2, rangées A à H de la plaque de microtitrage. Le second sérum est placé dans les cupules des colonnes 3 et 4, le troisième dans les colonnes 5 et 6, le sérum témoin positif dans les colonnes 7 et 8, le sérum témoin négatif dans les colonnes 9 et 10, et 50 µl de milieu HEPES de Eagle sans sérum sont déposés dans les colonnes 11 et 12 et dans tous les puits de la rangée H.
- iii) Une souche de référence de capripoxvirus, habituellement une souche de vaccine connue pour ses aptitudes à pousser facilement en culture de tissu ayant un titre logarithmique supérieur à 6 DICT₅₀ par ml, est diluée dans du milieu HEPES de Eagle et répartie dans des flacons-bijoux afin d'obtenir une série d'échantillons de virus dilués respectivement à 1/50, 1/40, 1/35, 1/20 et 1/15 DICT₅₀ par ml (équivalant en log₁₀ à 3,7 ; 2,7 ; 2,2 ; 1,7 ; 1,2 ; 0,7 et 0,2 DICT₅₀ par 50 µl).
- iv) Commencer par les puits de la rangée G et par la préparation virale la plus diluée en distribuant 50 µl dans chaque puits de la rangée. On répétera l'opération avec chaque dilution virale, la dilution de titre viral le plus élevé étant placée dans le puits A.
- v) Les plaques sont recouvertes par un couvercle ou un film plastique et placées dans une étuve pendant 1 h à 37 °C.
- vi) Une suspension de cellules de TA dans du milieu de Eagle additionné d'antibiotiques et de 2 % de sérum de veau foetal est préparée à partir de tapis cellulaires préalablement établis à raison de 10⁵ cellules/ml. A l'issue de l'incubation des plaques de titrage à 37 °C, 100 µl de suspension cellulaire

sont ajoutés à tous les puits, à l'exception des puits H11 et H12 qui servent de témoins pour le milieu. Les autres puits de la rangée H sont les témoins cellules et sérum.

- vii) Les plaques de titrage sont couvertes comme précédemment et mises à incuber pendant 1 h à 37 °C pendant 9 jours.
- viii) Les tapis cellulaires sont examinés quotidiennement pendant 4 jours pour la recherche d'un éventuel ECP à l'aide d'un microscope inversé. Les cellules de la rangée H ne doivent pas présenter d'ECP. Si l'on a utilisé la souche de capripoxvirus vaccinal 0240 KSGP, la lecture finale doit être effectuée le 9^e jour suivant l'inoculation, et le titre du virus sera calculé suivant la méthode de Kärber (1931). Si la lecture est différée, il se produit une dissociation du complexe Antigène-anticorps et le virus initialement neutralisé se sépare de l'anticorps.
- ix) *Interprétation des résultats* : le titre neutralisant correspond à la différence logarithmique entre le titre obtenu avec un sérum négatif et celui du sérum à tester. Une réduction de titre supérieure ou égale à 1,5 log correspond à un sérum positif. Le test peut être plus sensible lorsque l'on utilise un couple de sérums issu d'un même animal avant et après infection. Ce en raison du fait que, suite à une infection par le capripoxvirus, l'immunité à médiation cellulaire prédomine ; un résultat négatif, particulièrement consécutif à une vaccination à l'issue de laquelle la réponse immunitaire est nécessairement faible, ne signifie donc pas que l'animal dont le sérum est issu n'est pas protégé.

On a décrit une méthode à virus constant et sérum variable utilisant des dilutions de sérum s'étalant entre 1/5 et 1/500 et faisant appel à des cellules musculaires d'embryon de bovin. Du fait que la sensibilité de ces cellules au capripoxvirus est plus faible que celle des cellules de TA, le problème de dissociation du complexe antigène-anticorps est résolu.

Les anticorps dirigés contre le capripoxvirus dès le second jour suivant le début des signes cliniques. Ils restent détectables durant 7 mois, mais un accroissement significatif de leur titre peut être mis en évidence entre les 21^e et 42^e jours.

b) Immunodiffusion en gélose

L'épreuve d'immunodiffusion en gélose ne peut être recommandée comme épreuve sérologique de diagnostic de la DNC du fait de la réaction croisée avec la stomatite papuleuse et la pseudo-cowpox, à l'origine de résultats faussement positifs. La perte de sensibilité de l'épreuve peut aussi engendrer des résultats faussement négatifs.

c) Épreuve de détection des anticorps par immunofluorescence indirecte

Les cultures de tissu infectées sur lamelles de tubes de Leighton ou sur lames de microscope peuvent être utilisées pour les épreuves de détection des anticorps par immunofluorescence indirecte. Des cultures de tissu témoin non infectées et des sérums témoins positif et négatif seront inclus dans l'épreuve. Les cultures infectées et les témoins sont fixés dans l'acétone à -20 °C pendant 10 min et conservées à 4 °C. Les sérums à éprouver seront dilués dans le tampon PBS à partir du 1/20 ou du 1/40, et la positivité éventuelle de la réaction sera mise en évidence en utilisant des gamma-globulines anti-bovin conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine. Des réactions croisées peuvent se produire avec les virus de l'ecthyma, de la stomatite papuleuse et, peut-être également, avec d'autres poxvirus.

d) Analyse par western blot

L'analyse par western blot des sérums à éprouver contre un lysat cellulaire infecté par le capripoxvirus est un système sensible et spécifique, utilisable pour la détection des anticorps dirigés contre les protéines structurales du capripoxvirus mais cette épreuve est coûteuse et difficile à mettre en œuvre.

Les cellules de TA infectées par le capripoxvirus doivent être récoltées lorsque l'ECP atteint 90 % ; elles sont alors congelées-décongelées 3 fois de suite et les débris cellulaires culottés par centrifugation. Le surnageant doit être décanté et les protéines séparées par SDS/PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide/dodécyl sulfate de sodium). Un système de gel vertical discontinu faisant appel à un stacking gel à 5 % d'acrylamide en tampon Tris (125 mM), pH 6,8 et SDS (0,1 %) et à un gel de résolution constitué par de l'acrylamide (entre 10 et 12,5 %) en Tris (560 mM), pH 8,7 et du SDS (0,1 %) est recommandé pour cette utilisation avec un tampon – glycine courant contenant du Tris (250 mM), de la glycine (2 M), et du SDS (0,1 %). Les échantillons de surnageant doivent être chauffés par ébullition pendant 5 min dans un tampon de lyse approprié avant d'être chargés sur le gel. Alternativement du virus purifié ou des antigènes recombinants peuvent être utilisés à la place de l'antigène issu de la culture de tissu.

Des marqueurs de poids moléculaire doivent être déposés en même temps que les échantillons de protéines. Les protéines séparées sur gel de polyacrylamide doivent être transférées électrophorétiquement sur une membrane de nitrocellulose. Après le transfert, la membrane est rincée minutieusement en PBS puis bloquée en tampon PBS additionné de 3 % de sérum albumine bovine ou en PBS additionné de 5 % de lait en poudre. Cette opération devra être réalisée sur un agitateur-balançoire durant une nuit à 4 °C. La

membrane de nitrocellulose est ensuite découpée en bandes soit à l'aide d'un appareil permettant d'éprouver en même temps un grand nombre de sérums, soit manuellement, chaque bande étant traitée séparément par la suite. La membrane est lavée minutieusement dans 5 bains successifs de PBS pendant 5 min sur agitateur puis incubés à température ambiante pendant 1,5 h sur l'agitateur avec le sérum approprié dilué au 1/50 dans le tampon de blocage (PBS avec 3 % de sérum albumine bovine et 0,05 % de Tween 20 ou PBS avec 5 % de lait en poudre et 0,05 % de Tween 20). La membrane est à nouveau lavée minutieusement et incubée (dans le tampon de blocage) avec des immunoglobulines anti-espèce conjuguées à la peroxydase à une dilution déterminée par titrage. Après une nouvelle incubation à température ambiante pendant 1,5 h, la membrane est lavée, et une solution de tétra-hydrochlorure de diaminobenzidine (10 mg dans 50 ml de tampon Tris-HCl, pH 7,5 et 20 µl de peroxyde d'hydrogène à 30 % [poids/poids]) est ajoutée. Après une incubation de 3 à 7 min à température ambiante sur agitateur et sous observation constante, la réaction est stoppée par lavage en PBS avant qu'une coloration trop importante du fond ne se manifeste. Un sérum témoin positif et un sérum témoin négatif doivent être utilisés dans chaque épreuve.

Les échantillons positifs et le témoin positif doivent produire une réponse conforme à celle attendue pour des protéines de poids moléculaire de 67, 32, 26, 19 et 17 kDa (les protéines structurales majeures du capripoxvirus), tandis que les sérums négatifs ne donneront pas de réaction. Un sérum hyperimmun préparé vis-à-vis des parapoxvirus (stomatite papuleuse bovine, pseudo-variole) réagira avec plusieurs protéines du capripox virus mais pas avec la protéine de 32 kDa spécifique du capripoxvirus.

e) Méthode immuno-enzymatique

Un test ELISA pour la détection des anticorps dirigés contre le capripoxvirus a été mis au point en utilisant la protéine structurale P32 exprimée par le capripoxvirus et des anticorps monoclonaux préparés contre cette protéine (8).

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

Deux souches atténuées de capripoxvirus ont été utilisées dans la fabrication de vaccins spécifiques de la DNC (3, 4), d'une part une souche ovine du Kenya et un virus de la variole caprine ayant subi 18 passages sur cellules de TA ou sur cellules foetales de muscle de veau, d'autre part une souche d'Afrique du Sud ayant subi 60 passages sur cellules rénales d'agneau et 20 passages sur membrane chorioallantoïdienne d'œuf embryonné. Toutes les souches de capripoxvirus examinées, qu'elles proviennent de bovin, d'ovin ou de caprin, ont un site neutralisant majeur commun, ce qui détermine le fait que tout animal ayant guéri d'une affection causée par l'une des souches est résistant à l'infection causée par l'une des autres. En conséquence, il est possible de protéger les bovins contre la DNC en utilisant des souches de capripoxvirus issues de moutons ou de chèvres (10). En 1989 et 1990, la souche roumaine de variole ovine a été utilisée pour contrôler les foyers de DNC en Égypte (22). Cependant, il est indispensable d'effectuer des contrôles préalables, tout particulièrement dans les races les plus sensibles à l'acmé de la lactation, avant d'introduire une souche vaccinale non habituellement utilisée chez les bovins. La protection conférée par la vaccination persiste vraisemblablement toute la vie malgré la chute de l'immunité car le capripoxvirus se réplique au niveau du site d'inoculation, mais ne provoque pas d'infection généralisée. Les deux souches de capripoxvirus utilisées en routine dans les vaccins sont susceptibles de produire une vaste réaction locale au site d'inoculation, notamment dans les races de *Bos taurus* (11), ce que certains éleveurs acceptent difficilement. Ce fait a parfois empêché l'utilisation du vaccin, même si les conséquences pathologiques engendrées par un foyer de DNC sont inévitablement plus sévères.

Une nouvelle génération de vaccins contre les capripoxvirus, en cours de mise au point, fait appel au génome du capripoxvirus comme vecteur de gènes d'autres agents pathogènes pour les ruminants, comme par exemple les gènes des virus de la peste bovine ou de la peste des petits ruminants. Ce vaccin recombinant confère une protection à la fois contre la DNC et la peste bovine à la suite d'une seule vaccination (24, 27).

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Les souches de capripox virus utilisées pour la production des vaccins doivent être accompagnées d'un document mentionnant leur origine et le nombre de passages en culture ou sur animaux qu'elles ont subi. Elles doivent être inoffensives afin de pouvoir être utilisées chez tous les animaux auxquels elles sont destinées, y compris les femelles en gestation. Elles ne doivent également pas être transmissibles, rester atténuées à la suite d'un passage ultérieur en culture cellulaire et engendrer une protection totale durant une année au moins à la suite d'une épreuve virulente. Une certaine quantité de la semence primaire

vaccinale doit être préparée et conservée en vue de permettre la constitution d'une semence de travail destinée à une production régulière de vaccin.

b) Méthodes de culture

Les vaccins doivent être lyophilisés et conservés dans des fioles de 2 ml à -20°C . Elles peuvent aussi être conservées non déshydratées à -20°C mais, dans cet état, elles sont plus stables à -70°C ou à une température inférieure. Le virus doit être produit sur des cellules de TA, voire de cellules de mouton, en culture cellulaire de première ou seconde explantation afin d'obtenir une production virale maximale. Les cellules VERO peuvent également être utilisées pour cette production.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Les lots de virus doivent présenter les caractéristiques suivantes :

- i) *Pureté* : ils doivent être exempts de contaminants viraux, en particulier de pestivirus tels que ceux de la Border disease et de la Maladie des muqueuses, de bactéries, de champignons et/ou de mycoplasmes.
- ii) *Sécurité* : ils doivent produire un minimum de réactions cliniques dans toutes les races de bovin chez lesquelles il est utilisé dans le respect des voies recommandées.
- iii) *Efficacité* : ils doivent stimuler l'immunité des bovins quelle que soit leur race pendant au moins 1 an.

Les tests nécessaires pour réaliser ces contrôles sont décrits dans la section C.4.

2. Méthode de fabrication

Les lots de vaccin sont produits sur des tapis de cellules de TA en culture primaire ou secondaire fraîchement produites. Un échantillon du stock viral lyophilisé est remis en suspension dans du GMEM et inoculé à des tapis de cellules de TA préalablement lavés avec du PBS tiède puis mis à adsorber pendant 15 min à 37°C . La culture est ensuite recouverte de GMEM. L'ECP se manifeste au bout de 4 à 6 jours par une lyse de 50 à 70 % du tapis. La culture est alors congelée-décongelée 3 fois et la suspension obtenue est centrifugée à 600 *g* pendant 20 min. Avant d'être récoltée, la culture doit être examinée afin de détecter un éventuel ECP non spécifique, une opacité du milieu de culture ou un changement du pH traduisant une éventuelle contamination. Un second passage doit être effectué afin d'obtenir une quantité suffisante de virus pour la production d'un lot de vaccin (pour produire 10 millions de doses de vaccin, il est nécessaire d'utiliser 5 flacons de 175 cm²).

Ce procédé est renouvelé autant de fois que nécessaire et les culots cellulaires issus de chaque flacon sont récoltés individuellement et remis en suspension dans un volume égal d'hydrolysate de lactalbumine à 5 %, stérile et réfrigéré, additionné de 10 % de sucrose. Ils sont alors aliquotés en flacons numérotés avant d'être congelés à -20°C . Avant d'être stockés, 0,2 ml de chaque flacon sont prélevés en vue d'un contrôle de stérilité. 0,2 ml sont à nouveau prélevés. Un pool de 2 ml constitué d'échantillons de 0,2 ml chacun issus de 10 flacons est utilisé pour le titrage du virus. Un enregistrement du suivi de toutes les procédures sera conservé pour tous les lots de vaccin.

3. Contrôles en cours de fabrication

Cellules : les cellules doivent provenir de TA en bonne santé issu d'un troupeau indemne de tremblante. Durant leur mise en culture, elles ne doivent pas présenter d'ECP et avoir une morphologie normale (à prédominance fibroblastique). Elles peuvent normalement subir plus d'une dizaine de subcultures. Lorsqu'elles sont utilisées pour la production de vaccin, des cultures témoin non infectées doivent être réalisées en parallèle et maintenues en observation pendant un laps de temps au moins équivalent à la durée d'une subculture supplémentaire. Elles doivent être testées pour rechercher la présence d'une éventuelle souche non cytopathogène du virus de la diarrhée virale bovine ou de la Border disease par la technique d'immunofluorescence ou d'immunoperoxydase. Lorsque cela s'avère possible, les cellules sont préparées et triées avant la production vaccinale, et on en congèle un stock aliquoté (flacons de 1 à 2 ml contenant 20 millions de cellules/ml) dans du DMSO (diméthyle sulfoxyde) stérile en azote liquide. Le sérum utilisé dans le milieu de croissance doit être exempt d'anticorps anti-capripoxvirus et de pestivirus.

Virus : la souche de virus et le vaccin avec lequel il a été préparé doivent être titrés sur des cultures de tissu en tubes ou en microplaques. Bien qu'il suffise de 2 000 DICT₅₀ de virus pour obtenir une protection, il est recommandé que le vaccin soit fabriqué avec une souche de virus sauvage du Kenya ou d'Afrique du sud titrant au moins 3 500 DICT₅₀. Le capripoxvirus est très sensible aux rayons ultraviolets qui l'inactivent et il est nécessaire de tenir compte de ce fait pour éviter une éventuelle perte d'activité sur le terrain. Pour une utilisation chez les bovins sur le terrain du vaccin fabriqué avec la souche roumaine du virus de la variole du mouton, le titre

recommandé est de 2 500 doses infectieuses pour le mouton (DIM₅₀) et la dose de vaccin fabriqué avec la souche roumaine RM65 du virus de la variole du mouton est de 3 000 DICT₅₀ (11).

Des échantillons de vaccin doivent être testés pour la recherche d'éventuels contaminants viraux, en particulier de souches cytopathogènes et non cytopathogènes de pestivirus ; ils doivent être également mélangés avec un immunsérum de capripoxvirus de titre élevé et qui ne contient pas d'anticorps anti-pestivirus, afin de prévenir une éventuelle interférence du virus vaccinal lui-même lors de la réaction. Le vaccin doit être maintenu à -20 °C jusqu'à la fin des titrages et des tests de stérilité, temps au bout duquel il peut être lyophilisé. Un titrage supplémentaire peut être réalisé sur 5 flacons de vaccin lyophilisé prélevés au hasard, afin de confirmer le titre.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et d'absence de contamination à partir de matériel biologique sont décrits au Chapitre I.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité et efficacité

Six bovins sensibles au virus de la DNC sont placés dans une unité de haute sécurité pour grands animaux et du sang leur est prélevé. Cinq flacons de vaccin lyophilisé sont choisis au hasard. On rajoute à chacun du PBS stérile pour les reconstituer et on les mélange. Deux des bovins reçoivent 100 doses de vaccin. Le restant du vaccin est dilué dans du PBS stérile et deux autres bovins sont inoculés par voie sous-cutanée avec la dose vaccinale recommandée. Les deux derniers animaux servent de témoin. Tous les bovins subissent un examen clinique quotidien et leur température rectale est relevée. Le 21^e jour suivant la vaccination, une prise de sang est à nouveau réalisée sur les 6 animaux, à la suite de laquelle ils reçoivent une épreuve virulente d'une souche connue de capripoxvirus par inoculation intradermique. Ils sont ensuite examinés durant les 2 semaines suivantes. Les animaux témoins doivent développer des signes cliniques de DNC, tandis que les bovins vaccinés ne doivent présenter aucune réaction locale ou générale autre qu'une réaction d'hypersensibilité de type retardé qui doit disparaître au bout de 4 jours. Des prélèvements de sérum sont à nouveau effectués le 30^e jour après la vaccination. Les échantillons de sérum prélevés le 21^e jour font l'objet d'une séroneutralisation vis-à-vis de souches virales sélectionnées ayant pu contaminer le vaccin pendant sa préparation, et les sérums prélevés le jour de la vaccination et 1 mois plus tard sont également testés vis-à-vis du pestivirus pour confirmer l'absence d'une éventuelle contamination. Du fait de la variabilité de la réponse des bovins à l'épreuve virulente réalisée avec le virus de la DNC, une maladie généralisée ne doit pas être systématiquement recherchée chez les animaux témoins mais seulement une importante réaction locale.

Le vaccin reconstitué est également testé chez la souris et le cobaye. Deux cobayes reçoivent 0,5 ml de vaccin par voie intramusculaire au niveau de la patte postérieure, tandis que 2 autres cobayes et 6 souris reçoivent respectivement, par voie intrapéritonéale, 0,5 et 0,1 ml de la suspension vaccinale. Deux cobayes et 4 souris sont conservés comme témoins non inoculés. Les animaux sont observés durant 3 semaines, sacrifiés de façon humanitaire et autopsiés. Ils ne doivent pas présenter de pathologie liée au vaccin.

c) Tests d'activité

Chez les bovins, les tests d'activité ayant trait aux souches de capripoxvirus doivent être entrepris lorsque la dose minimum immunisante n'est pas connue. Celle-ci est généralement déterminée par comparaison des titres des épreuves virulentes effectuées sur les flancs d'animaux vaccinés et non vaccinés. À la suite de la vaccination, les flancs d'au moins 3 bovins ayant reçu le vaccin et de 3 témoins sont rasés. Des dilutions logarithmiques de virus d'épreuve sont préparées en PBS stérile et 6 dilutions sont injectées par voie intradermique (0,1 ml par inoculum) sur une ligne horizontale sur le flanc des animaux. Ces injections sont répétées 3 fois avec les mêmes dilutions sur 3 lignes au dessous de la ligne supérieure. Un œdème localisé peut se développer au niveau des 24 points d'inoculation chez les animaux témoins, bien qu'il soit préférable qu'il ne se manifeste qu'une petite réaction ou pas de réaction du tout au niveau des 4 sites où la plus grande dilution de virus a été injectée. Les animaux vaccinés peuvent manifester dans les 24 h après l'injection une réaction d'hypersensibilité qui doit s'atténuer rapidement. Des petites aires de nécrose peuvent se produire au niveau du point d'inoculation du virus le plus concentré. Le titre du virus est évalué tant chez les animaux vaccinés que chez les témoins ; une différence de titre de 2,5 log₁₀ permet de conclure à une bonne protection.

d) Durée de l'immunité

L'immunité conférée par la vaccination avec la souche sauvage kenyane virulente est d'au moins 2 ans, celle conférée par la souche de vaccin sud-africain est de 3 ans, et la protection obtenue à la suite d'une épreuve virulente persiste toute la vie. La durée de l'immunité produite par d'autres souches vaccinales doit

être vérifiée chez les bovins en effectuant des tests de contrôle dans une zone où il n'y a aucune possibilité d'interférence avec d'autres souches sauvages de capripoxvirus.

e) Stabilité

Un vaccin contre la DNC correctement lyophilisé, particulièrement s'il contient un agent protecteur tel que du sucrose ou de l'hydrolysate de lactalbumine, est stable pendant 25 ans s'il est stocké à -20 °C, et 2 à 4 ans lorsqu'il est conservé à 4 °C. Il est évident qu'il est également stable à des températures plus élevées mais aucune expérimentation permettant de le vérifier n'a jusqu'à présent été effectuée.

f) Agents de conservation

Aucun agent conservateur autre qu'une substance protectrice telle que du sucrose ou de l'hydrolysate de lactalbumine n'est requis pour les préparations lyophilisées.

g) Précautions d'emploi et Mise en garde

Aucune précaution spéciale n'est à prendre mis à part celles concernant la stérilité et l'éventuelle contamination par d'autres agents viraux. Le virus de la DNC ne présente aucun risque pour la santé humaine.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Les tests de sécurité doivent être effectués sur chaque lot de vaccin comme décrit dans la section C.4.b.

b) Efficacité

Lorsque l'efficacité d'une souche destinée à être utilisée dans la fabrication d'un vaccin a été déterminée quant à la dose minimum permettant d'engendrer l'immunité, il n'est pas nécessaire de réitérer les essais sur chaque lot, à la condition que le titre du virus présent ait été vérifié.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BLACK D.N., HAMMOND J.M. & KITCHING R.P. (1986). Genomic relationship between capripoxviruses. *Virus Res.*, **5**, 277–292.
2. BURDIN M.L. (1959). The use of histopathological examination of skin material for the diagnosis of lumpy skin disease in Kenya. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, **7**, 27–36.
3. CAPSTICK P.B. & COAKLEY W. (1961). Protection of cattle against lumpy skin disease. Trials with a vaccine against Neethling type infection. *Res. Vet. Sci.*, **2**, 362–368
4. CARN V.M. (1993). Control of capripoxvirus infections. *Vaccine*, **11**, 1275–1279.
5. CARN V.M. (1995). An antigen trapping ELISA for the detection of capripoxvirus in tissue culture supernatant and biopsy samples. *J. Virol. Methods*, **51**, 95–102.
6. CARN V.M. & KITCHING R.P. (1995). An investigation of possible routes of transmission of lumpy skin disease virus (Neethling). *Epidemiol. Infect.*, **114**, 219–226.
7. CARN V.M. & KITCHING, R.P. (1995). The clinical response of cattle following infection with lumpy skin disease (Neethling) virus. *Arch. Virol.*, **140**, 503–513.
8. CARN V.M., KITCHING R.P., HAMMOND J.M., CHAND P., ANDERSON J. & BLACK D.N. (1994). Use of a recombinant antigen in an indirect ELISA for detecting bovine antibody to capripoxvirus. *J. Virol. Methods*, **49**, 285–294.
9. CHIHOTA C., RENNIE L.F., KITCHING R.P. & MELLOR P.S. (2001). Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Epidemiol. Infect.*, **126**, 317–321.
10. COAKLEY W. & CAPSTICK P.B. (1961). Protection of cattle against lumpy skin disease. Factors affecting small scale production of tissue culture propagated virus vaccine. *Res. Vet. Sci.*, **2**, 369–371.

11. COETZER J.A.W. (2004). Lumpy skin disease. *In: Infectious Diseases of Livestock, Second Edition* Coetzer J.A.W. & Justin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, 1268–1276.
12. DAVIES F.G. (1991). Lumpy Skin Disease, a Capripox Virus Infection of Cattle in Africa. FAO, Rome, Italy.
13. DAVIES F.G., KRAUSS H., LUND L.J. & TAYLOR M. (1971). The laboratory diagnosis of lumpy skin disease. *Res. Vet. Sci.*, **12**, 123–127.
14. GERSHON P.D. & BLACK D.N. (1987). Physical characterization of the genome of a cattle isolate of capripoxvirus. *Virology*, **160**, 473–476.
15. GERSHON P.D., KITCHING R.P., HAMMOND J.M. & BLACK D.N. (1989). Poxvirus genetic recombination during natural virus transmission. *J. Gen. Virol.*, **70**, 485–489.
16. HAIG D. (1957). Lumpy skin disease. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, **5**, 421–430.
17. IRELAND D.C. & BINEPAL Y.S. (1998). Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J. Virol. Methods*, **74**, 1–7.
18. IRONS P.C., TUPPURAINEN E.S.M. & VENTER E.H. (2005). Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen. *Theriogenology*, **63**, 1290–1297.
19. KITCHING R.P., BHAT P.P. & BLACK D.N. (1989). The characterization of African strains of capripoxvirus. *Epidemiol. Infect.*, **102**, 335–343.
20. KITCHING R.P., HAMMOND J.M. & BLACK D.N. (1986). Studies on the major precipitating antigen of capripoxvirus. *J. Gen. Virol.*, **70**, 485–489.
21. KITCHING R.P. & SMALE C. (1986). Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Res. Vet. Sci.*, **41**, 425–427.
22. MICHAEL A., SABER M.S., SOOLIMAN S.M., MOUSA A.A., SALAMA S.A., FAYED A.A., NASSAR M.I. & HOUSE J. (1996). Control of lumpy skin disease in Egypt with Romanian sheep pox vaccine. *Assiut. Vet. Med. J.*, **36**, 173–180.
23. PROZESKY L. & BARNARD B.J.H. (1982). A study of the pathology of lumpy skin disease in cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **49**, 167–175.
24. ROMERO C.H., BARRETT T., EVANS S.A., KITCHING R.P., GERSHON P.D., BOSTOCK C. & BLACK D.N. (1993). Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. *Vaccine*, **11**, 737–742.
25. TULMAN E.R., AFONSO C.L., LU Z., ZSAK L. KUTISH G.F. & ROCK D.L. (2001). Genome of Lumpy Skin Disease Virus. *J. Virol.*, **75**, 7122–7130.
26. TUPPURAINEN E.S.M., VENTER E.H. & COETZER J.A.W. (2005). The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **72**, 153–164.
27. WALLACE D.B. & VILJOEN G.J. (2005). Immuno responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine*, **23**, 3061–3067.
28. WEISS K.E. (1968). Lumpy skin disease. *Viol. Monogr.*, **3**, 111–131.

*
* *

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