

210001563

REPUBLIQUE DU SENEGAL

-----  
INSTITUT **SENEGALAIS**  
**DE RECHERCHES** AGRICOLES  
-----

LABORATOIRE NATIONAL DE  
L'ELEVAGE ET DE RECHERCHES  
B.P. 2057 **Dakar-Hann**  
Tel: 221 832 36 78  
Fax: 221 832 21 18

INSTITUTE FOR ANIMAL  
**HEALTH**  
**PIRBRIGHT LABORATORY**  
Ash Road, Pirbright  
Surrey GU24 0NF  
United Kingdom  
Tel: 44 01483 232441  
Fax: 44 01483 232440

**TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC DE LA FIEVRE APHTEUSE:**  
TECHNIQUES DE CULTURE DE CELLULES,  
DE DETECTION DE L'ANTIGENE VIRAL, DES ANTICORPS ANTI  
VIRUS, DE **POLYMERASE** CHAIN REACTION ET DE SEQUENCAGE,

Rapport de otage effectue du 21 avril au 21 Mai 1998 par Yaya  
Thiongane au Laboratoire de **Reference** Mondial de la Fievre  
aphteuse de Pirbright, Woking, Surrey, Grande Bretagne

Mai 1998

## PROGRAMME

1. Semaine du 21 au 25 **Avril** 1998.
  - 1.1. Presentation des regles de securite en usage au Laboratoire de Pirbright.
    - Presentation du laboratoire.
    - Visionnage de Films sur la securite.
    - **Etablissement** de Badges.
  - 1.2. **Techniques** de cultures de cellules:
    - Cellules de lignee de rein de porc.
    - Cellules primaires de thyroide de veau.
- II. Semaine **du** 28 au 1 Mai 1998.  
(avec **Nigel Ferris**)
  - 2.1. **Tests** de **detection** de **l'antigene** du virus.
  - 2.2. Techniques de preparation des **reactifs**.
- III. Semaine du 4 au 8 Mai 1998.  
(avec **Teli Rendle**)
  - 3.1. Tests de detection des anticorps anti-virus.
    - Technique de titrage de l'antigene du virus de la F.A.
    - Technique de titrage de l'anticorps **anti-**virus de la P.A.
  - 3.2. Technique de **caracterisation** du virus de la F.A.
- IV. Semaine du 11 au 15 Mai 1998.  
(avec Bob Armstrong, Sott & David)
  - 4.1. Technique de seroneutralisation,
  - 4.2. Technique de P.C.R.
  - 4.3. Technique de sequencage.
- V. Semaine du 18 au 21 Mai 1998.  
(avec **P.Kitching**)
  - 5.1. Synthese.
  - 5.2. Visite de **l'insectarium**.
  - 5.3. Visite du Laboratoire **MERIAL**.
  - 5.4. Le **21/05/98** retour au **Senegal**.

## **PLAN**

### **GENERALITES SUR LA FIEVRE APHTEUSE.**

#### **1 TECHNIQUES D'ISOLEMENT DU VIRUS DE LA FIEVRE APHTEUSE.**

- 1.1 Techniques de culture des cellules primaires de thyroïde de veau.
- 1.2 Techniques d'isolement du virus.

#### **II. TECHNIQUES SEROLOGIQUES.**

- 2.1 Technique de détection des antigènes.
- 2.2 Techniques de détection des anticorps:
  - 2.2.1 Titrage de l'antigène.
  - 2.2.2 Titrage du **Serum** par **Elisa**.
  - 2.2.3 Titrage du sérum par **SN**.
- 2.3 Technique de **caractérisation** du virus.
- 2.4 Technique de **séronéutralisation**.

#### **III. TECHNIQUES GENÉTIQUES.**

- 3.1. Technique de **Polymerase Chain Reaction**.
- 3.2. Technique de **Séquencage**.

#### **IV. BIBLIOGRAPHIE.**

#### **v. ANNEXES.**

**Resultats** des tests réalisés du 21/04 au 21/5/1998 au laboratoire de **Reference** Mondial de la fièvre aphteuse.

#### **VI. REMERCIEMENTS.**

## 1. GÉNÉRALITÉS SUR LA FIÈVRE APHTEUSE.

La fièvre aphteuse est une maladie infectieuse et fortement contagieuse due à un virus du genre **Aphthovirus** de la famille des **Picornaviridae** et atteint plusieurs espèces animales, **essentiellement** les bovins, les porcins, plus **rarement** les petits ruminants et les dromadaires. Elle se manifeste par une **forte morbidité**, une faible **mortalité** et des lésions **vésiculeuses** et érosives des muqueuses de la bouche, de la peau des espaces interdigités et des mamelles. Elle est à l'origine de **pertes économiques** importantes surtout dans les élevages intensifs par **l'arrêt** de la production laitière et de la restriction des exportations des produits d'origine animale des pays atteints. La fièvre aphteuse, maladie de la liste A, de l'OIE, est **très** largement **répandue** mais reste endémique dans les pays tropicaux. Elle est absente des **régions** comme l'Amérique du nord, l'Australie, la Nouvelle Zélande et le Japon. La maladie a été éliminée de l'Europe par la vaccination et des mesures de prophylaxie sanitaires strictes **comme** l'abattage, le contrôle des importations et les **mesures** de quarantaine.

Dans les zones **endémiques**, la persistance de la maladie est **favorisée** par l'existence de porteurs sains, l'absence ou les **problèmes** de la vaccination et les **modes d'élevage** utilisés.

Le virus **présente 7 sérotypes**: O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 et ASIA1. Les sérotypes O, A, C sont largement **répandus** mais les sérotypes **SAT1, 2, 3** restent confinés au continent africain alors que le sérotype **ASIA 1** est rencontré uniquement en Asie.

Au laboratoire, le cobaye et le souriceau nouveau-né (voie intrapéritoneale) sont utilisés pour le diagnostic (**isolement et titrage** du virus). Les cellules primaires (de bovins et de porcins) et les cellules de lignée **comme** la BHK21 peuvent être **utilisées**. Les tests **serologiques** **comme** la fixation du complément et **l'ELISA** sont utilisés pour les **enquêtes épidémiologiques**.

La lutte contre la maladie passe par l'application de mesures sanitaires strictes dans les **zones** indemnes. Dans les **zones** endémiques, la vaccination en masse des **espèces** animales sensibles permet soit d'éradiquer la maladie ou de réduire son impact à un niveau acceptable.

## I TECHNIQUES D'ISOLEMENT DU VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE.

1.1 Techniques de culture des cellules primaires de **thyroïde** de **veau**.

111 Matériels:

- Boite d'instruments avec: pince, ciseaux, bistouris et lames;
- **Flacons de PBS sans Ca-Mg avec antibiotiques;**
- Flacons de milieu **MEMG** avec 10% de **SV**;
- **Bechers;**
- Pipettes de 5 et 10 ml;
- Thyroïde de fœtus ou de **veau**;
- **Flacon d'enzyme (Dispase au Trypsine);**
- Flacon de Trypan Bleu;
- Barreau **aimanté**;
- **Hématimètre;**
- **Entonnoir avec de la gaze;**

112: Découper la Thyroïde:

- **Débarrasser** la thyroïde des tissus et de la graisse qui l'entourent;
- Rincer la **glande** avec de **Tampon PBS sans ca-Mg avec antibiotiques;**
- **Découper la glande dans un bœcher vide en menus morceaux;**
- **Rincer (10 fois) les morceaux dans le même tampon;**
- Reprendre les morceaux dans du milieu de culture a 10% de **SV**;
- **Laisser la glande dans son milieu de culture a +4c pendant une nuit.**

113: Digérer la glande **avec de la Dispase:**

- **Débarrasser la glande de son milieu de culture;**
- Rincer la glande avec le **même** tampon PBS sans Ca-Mg avec Antibiotiques;
- Ajouter 100 ml **de dispase** et mettre **sous agitation a 37°C** pendant une heure;
- Reprendre la Dispase surnageant les morceaux de thyroïde;
- Centrifuger 2000 **t/mn** pendant 10 mn;
- Ajouter 100 ml de dispase frais aux morceaux de thyroïde pour une seconde digestion de **1** heure a 37°C;
- centrifuger 2000 **T/mn** pendant 10 mn;

114: Ensemencer les cellules de thyroïde:

- Reprendre les culots de centrifugation dans du milieu de culture a 10% de **SV**;
- **Numerer** les cellules;
- Filtrer les cellules;
- Diluer les cellules dans du milieu de culture a 10% de **SV** de manière a avoir 106 cellules par ml;
- Repartir les cellules dans les tubes ou des flacons;
- Incuber les tubes et les flacons a **37°C**.

Le tapis cellulaire se **développe** en 48 heures et **présente** des cellules épithéliales et des cellules fibroblastiques,

### 1.2 Technique d'isolement du virus.

Elle permet d'isoler le virus de la FA a partir d'échantillon (**épithélium** lingual, sang, raclage du **pharynx**) provenant d'animal suspect ou de surnageant de cellules infectées sur des cultures de cellules de thyroïde de veau ou des cellules de **lignée** de rein de porc.

1.2.1: Préparation de l'échantillon:

- **Sortir le prélèvement** de son milieu de transport (Tampon PBS glycérol) et **découper** un morceau de ce **prélèvement** et le peser et **déterminer** la quantité de tampon a employer **pour** obtenir une suspension **a 10%**, comme par exemple: le poids de l'échantillon de 0.627 g a multiplier par 9 pour obtenir 5.643 ml de tampon PBS a utiliser pour une suspension de 10%.

**NB:** Le virus de la FA est **très** sensible au pH acide alors Il **faut vérifier** le **PH** du milieu de transport de l'échantillon avec une solution de rouge de phénol: ajouter a 6 gouttes du milieu de traneport le **même** nombre de gouttes (6) de solution de rouge de **phénol** et **apprécier** le **pH** du milieu de transport par la couleur du mélange obtenu.

- **Broyer** le **prélèvement** avec du sable **stérile** dans un mortier avec un pilon mais auparavant il faut avoir **découper** le morceau de tissu en petits fragments avec **les** ciseaux,

- Centrifuger le broyât a S-6000 **t/mn** pendant 10 **mn**,

- **Récupérer** le surnageant (contenant le virus ) dans un tube de 10 ml et reprendre 1.4 ml de ce surnageant dans un tube de 2 ml pour la recherche de **l'antigène** viral par la technique **ELISA**,

**1.2.2:** Inoculation des cellules en tubes (cellules de thyroïde de veau et cellules de rein de porc) par 0.2 ml. du surnageant:

- Vider le surnageant des cultures de cellules de 5 tubes par **type de** cellules, et prévoir des tubes de cellules **témoin** de thyroïde de veau et de rein de porc,

- **Ajouter** 0.2 ml de surnageant viral a 'chaque tube soit 2 ml de surnageant pour les 2x5 tubes de cellules de **thyroïde** de veau et de rein de porc,

- Incuber les 10 tubes de cellules **inoculées** et les 10 tubes de cellules **témoin** a 37 C pendant 30 mn (face du tube avec les cellules vers le bas pour que l'inoculum puisse recouvrir les cellules),

- Ajouter 1 ml de milieu de culture **sans sérum** aux 20 tubes (10 tubes inoculés et 10 tubes **témoin**),

- Incuber les tubes a 37C sur des supporta roulants

**1.2.3** Mise en **évidence** de la **présence** du virus de la FA **par** l'apparition de l'effet cytopathogène au bout de 24 heures (le virus est alors isolé): les cellules primaires de porc **sont** les plus sensibles que les cellules de **lignée** de rein de porc,

- **Récupérer** le surnageant des tubes **présentant** un effet **cytopatogène (ECP)** (contenant le virus de la FA) dans un tube de 10 ml par type de cellules.

**NB:** Le surnageant des cellules avec ECP est traite **comme** le **broyât** de **l'échantillon (étape 1.2.1)** pour la **détection** de l'antigène viral par la technique **ELISA**.

**NB:** Le **virus** de la FA **est** très sensible aux variations de **pH**, surtout **très** sensibles aux **pH** acides (inactivation aux **pH<6.8**).

## II. TECHNIQUES SEROLOGIQUES:

### 2.1. Technique de detection des antigenes.

Elle permet de determiner le ou les types d'antigenes **O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1** du virus de la fièvre aphteuse presenté dans les **echantillons** (**epithelium** lingual, **sang**, raclage du pharynx) provenant d'animal suspect ou dans les **surnageants** de cellules infectees de thyroide de veau (cellules primaires) ou de rein de porc (cellules de lignee) par la technique **Elisa**.

#### 2.1.1 Materiel et reactifs necessaires:

##### 2.1.1.1 Materiel:

- Spectrophometre
  - Agitateur de plaque
  - Laveur de plaques
  - Pipette:  
multicanaux (**5-50ul, 50-300ul**), **simples** (**1-10ul, 5-40ul, 40-200ul, 200-1000ul**)
  - Rigolee pour reactifs:  
a 8 compartiments pour 8 reactifs differents  
a 1 compartiment pour 1 **reactif**
  - Appareil de distillation d'eau (eau de type 1, resistivite de **18 megohms, sans agent pyrogenes**)
  - Microplaques a 96 cupules
  - **Refrigerateur** (temperatures de + 2 a +6 C)
  - Congelateur (temperatures de -15 a -20 c)
  - **Incubateur** (temperatures de t **35** a t**39** C)
  - Bain Marie (temperatures de + 35 a t**39** C)
  - **Phmetre**
  - Verrerie:  
**Bechers** de **20-400ml**, eprouvettes de 10-2000 ml, pipettes **graduees** de 1 a 20 ml, flacons de 1 a 100 ml, tubes de 2 a 4 ml et leurs boites de rangement, bidons de 5 a 10 litres
  - Cryotubes de 1-5 ml  
Melangeur Voortex,
  - Balance de **precision** (+/- 0.1 mg)
  - Mortier et pilon
  - Sable sterile
  - Minuteur avec alarme,
  - Serviette et papier buvard,
  - Etiquettes collantes et marqueurs indelebiles
- ##### 2.1.1.2 Tampons et reactifs:
- Tampon **PBS**,
  - Tampon de sensibilisation,
  - Tampon de dilution des antigenes,
  - Tampon de dilution du **serum** de detection et du conjugue,
  - Solution chromogene ou OPD,
  - Eau **oxygenee**,
  - Solution d'acide sulfurique,
  - Solution **desinfectante**,
  - Solution de rouge de phenol,
  - Solution d'aaide,
  - **Solution** de lavage des plaques,
  - Serum de lapin anti 8 **serotypes** du virus de la FA (**O, A, c, SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1, SVDV**) et du virus de la maladie vesiculeuse du porc,
  - Serum de cobaye **anti** 8 serotypes du virus de la FA et du virus de la maladie vesiculeuse du porc,
  - Serum de lapin anti **immunoglobuline** de cobaye conjugue a la peroxydase,

- Antigenes de reference (8 serotypes du virus de la FA et de la maladie vesiculeuse du porc),

### 2.1.2 Sensibilisation des plaques avec les serums de lapin anti-serotypes 0, A, c, SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1 et SVDV:

- Preparer du tampon de fixation a pH 9.6+/-0.05:

Dissoudre une capsule de carbonate-bicarbonate dans 100 ml d'eau distillee (tampon a 0.05M) et a garder a +4c pendant une semaine, Diluer les 8 serums de lapin anti types 0, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1 et SVDV au 1/1000 dans le tampon de fixation a pH 9.6, soit 1 ul de serum anti-types dans 1000 ul (1 ml)

NB: la dilution se fait dans un rigole a 8 canaux.

Repartir les 8 serums de lapin anti-serotypes dilues au 1/1000 dans les 8 rangees de la plaque, a raison de 50 ul par cupule:

Rangee A1-12:	SEROTYPE	0
Rangee B1-12:	SEROTYPE	A
Rangee C1-12:	SEROTYPE	C
Rangee D1-12:	SEROTYPE	SAT1
Rangee E1-12:	SEROTYPE	SAT2
Rangee F1-12:	SEROTYPE	SAT3
Rangee G1-12:	SEROTYPE	ASIA1
Rangee H1-12:	SEROTYPE	SVDV

Placer les plaques a 37 C pendant 1 heure sous agitation ou + 4 c pendant une nuit.

### 2.1.3 Repartition des antigenes de reference et des echantillons suspects:

- Laver les plaques 3 fois avec du PBS,

- Diluer les antigenes de reference 0, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1, SVDV au 1/5, 1/25 et 1/125 dans les 3 premieres colonnes 1, 2, 3 de la plaque

Colonne 1:

antigenes de reference 0, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1, SVDV au 1/5, (80 ul de tampon avec 20 ul d'antigene):

1A:	antigene de reference 0	dilue au 1/5
1B:	antigene de reference A	dilue au 1/5
1C:	antigene de reference C	dilue au 1/5
1D:	antigene de reference SAT1	dilue au 1/5
1E:	antigene de reference SAT2	dilue au 1/5
1F:	antigene de reference SAT3	dilue au 1/5
1G:	antigene de reference ASIA1	dilue au 1/5
1H:	antigene de reference SVDV	dilue au 1/5

Colonne 2:

antigenes de reference 0, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1, SVDV au 1/25, (80 ul de tampon avec 20 ul d'antigene de la colonne 1)

2A:	antigene de reference 0	dilue au 1/25
2B:	antigene de reference A	dilue au 1/25
2C:	antigene de reference C	dilue au 1/25
2D:	antigene de reference SAT1	dilue au 1/25
2E:	antigene de reference SAT2	dilue au 1/25
2F:	antigene de reference SAT3	dilue au 1/25
2G:	antigene de reference ASIA1	dilue au 1/25
2H:	antigene de reference SVDV	dilue au 1/25

Colonne 3:

antigenes de reference 0, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1, SVDV au 1/125, (80 ul de tampon avec 20 ul d'antigene de la colonne 2)

3A:	antigene de reference 0	dilue au 1/125
3B:	antigene de reference A	dilue au 1/125

**3C:** antigène de référence C dilué au 1/125  
**3D:** antigène de référence **SAT1** dilué au 1/125  
**3E:** antigène de référence **SAT2** dilué au 1/125  
**3F:** antigène de référence **SAT3** dilué au 1/125  
**3G:** antigène de référence **ASIA1** dilué au 1/125  
**3H:** antigène de référence SVDV dilué au 1/125

*NB: les 8 antigènes de référence sont directement dilués dans la plaque dans les rangées correspondantes à leurs serotypes dans du tampon PBS avec rouge de phénol.*

- Repartir les **échantillons** non dilués dans les autres colonnes et **rangées** de la plaque: le reste de la plaque est utilisé pour deux **échantillons**:

Colonnes **5A-H, 6A-H, 7A-H** : Echantillon **N1** non dilué, à raison de 50 µl par cupule,

Colonnes **9A-H, 10A-H, 11A-H**: Echantillon **N2** non dilué, à raison de 50 µl par cupule,

- Retenir les colonnes **4A-H, 8A-H, 12A-H** pour des colonnes **temoins** négatifs, à raison de 50 µl de **tampon** PBS par cupule (pas d'antigène, pas d'échantillon),

- Incuber la plaque à **37** C pendant une heure sous agitation,

**2.1.4** Repartition des **serums** de **détection de cobaye** antiserotype **O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1, SVDV**:

- Laver la plaque 3 fois dans du tampon PBS,

- Préparer le tampon de détection : du tampon PBS à 5 % de lait écrémé

- Diluer les serums de cobaye antiserotypes **O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1, SVDV** au 1/100, à raison de 10 µl dans 1000 µl de tampon de détection,

*(NB: Les dilutions sont faites dans un rigole à 8 rangées.)*

- Repartir les serums de cobaye anti-serotype dilués à raison de 50 µl par cupule, un **serotype** par rangée:

Rangée A1-12:	ANTI-SEROTYPE	O
Rangée B1-12:	<b>ANTI-SEROTYPE</b>	<b>A</b>
Rangée C1-12:	ANTI-SEROTYPE	C
Rangée D1-12:	ANTI-SEROTYPE	<b>SAT1</b>
Rangée E1-12:	<b>ANTI-SEROTYPE</b>	<b>SAT2</b>
Rangée F1-12:	ANTI-SEROTYPE	<b>SAT3</b>
Rangée G1-12:	ANTI-SEROTYPE	<b>ASIA1</b>
Rangée H1-12:	ANTI-SEROTYPE	<b>SVDV</b>

- Incuber à 37 C pendant une heure sous agitation,

**2.1.5** Repartition du **serum** de lapin conjugué avec la peroxydase

- Laver la plaque 3 fois avec du tampon PBS pour enlever le serum de cobaye,

- Diluer le serum de lapin **anti-cobaye** conjugué au 1/200, à raison de 35 µl dans 7000 µl de tampon de **détection** (cad à 5 % de lait écrémé)

- Repartir 50 **ul** du serum de lapin conjugue dilue dans tous les cupules, a raison de 50 **ul** par cupule,

- Incuber a 37 C pendant 40 **mn** et sous agitation,

#### 2.1.6 Repartition du substrat de l'enzyme peroxydase

- Laver 3 fois avec du tampon **PBS** pour **eliminer** le **serum** conjugue (DB: toute trace de conjugue peut fausser la lecture ulterieure)

- Preparer le substrat de l'enzyme: de l'eau oxygenenee dilue a **1/2000** dans de **l'OPD**, a raison de 5 **ul** de **H2O2** dans **10 0000 ul** de OPD,

- Repartir 50 **ul** du substrat dans tous les cupules, a raison de **50 ul** par cupule,

- Laisser la plaque a la temperature ambiante (a **l'obscurite**) pendant 15 **mn**,

(**Tester** le substrat en melangeant **50 ul** de conjugue dilue a **50 ul** de substrat par **l'apparition** de la coloration, **temoin** de l'action **enzymatique**)

#### 2.1.7 **Arret** de la reaction enzymatique avec de l'acide

- Repartir 50 **ul** de solution acide par cupule pour arreter la reaction enzymatique,

#### 2.1.8 Lecture des densites optiques a 492 nm

- Lire les plaques au spectrophotometre a la longueur d'onde de 492.

- Les cupules contenant les antigenes de **reference** sont toutes colorees avec une intensite decroissante avec la dilution de l'antigene.

- Les **echantillons** positifs sont colorees au niveau de la rangee contenant le type d'antigene viral en cause: par exemple, une coloration de l'echantillon au **nieau** de la rangee D montre un antigene du type **SAT1**

Rangee A1-12:	<b>SEROTYPE</b>	0
Rangee B1-12:	<b>SEROTYPE</b>	A
Rangee C1-12:	<b>SEROTYPE</b>	C
Rangee D1-12:	<b>SEROTYPE</b>	<b>SAT1</b> (Colore aux <b>D5D6D7</b> )
Rangee E1-12:	<b>SEROTYPE</b>	<b>SAT2</b>
Rangee F1-12:	<b>SEROTYPE</b>	<b>SAT3</b>
Rangee G1-12:	<b>SEROTYPE</b>	<b>ASIA1</b>
Rangee H1-12:	<b>SEROTYPE</b>	<b>SVDV</b>

#### 2.1.8 Interpretation:

Le **prelevement** possede un antigen du virion de la **FA** du type **SAT1**.

## 2.2. **Technique** de titrage de **l'antigene** du virus de la **fièvre** aphteuse.

Elle permet de quantifier l'antigene (virus titer) present dans l'echantillon viral (surnageant de culture de cellules infectees) et de determiner la dose d'antigene necessaire pour les tests serologiques (dilution for reaction with serum),

221 Matériel:

### 2211 Matériel

- Spectrophometre
- Agitateur de plaque
- Laveur de plaque
- Pipette:  
multicanaux (5-50ul, 50-300ul), simples (1-10ul, 5-40ul, 40-200ul, 200-1000ul)
- Rigoles pour reactifs: a 1 compartiment pour 1 reactif
- Appareil de distillation d'eau (eau de type 1, resistivite de 18 megohms, sans agents pyrogenes)
- Microplaques à 96 cupules pour test ELISA
- Microplaques à 96 cupule pour test Fixation du complément
- Refrigeraateur (temperatures de t 2 a t6 C)
- Congelateur (temperatures de -15 a -20 C)
- Incubateur (temperatures de t 35 a t39 C)
- Bain Marie (temperatures de t 35 a +39 C)
- Phmetre
- Verrerie:  
Bechers de 20-4000ml, eprouvettes de 10-2000 ml, pippettes graduees de 1 a 20 ml, flacons de 1 a 100 ml, tubes de 2 a 4 ml et leurs boites de rangement, bidons de 5 a 10 litres

- Cryotubes de 1-5 ml

Melangeur Voortex,

- Hiniteur avec alarme,
- Serviette et papier buvard,
- Etiquette collantes et marqueurs indelebiles

#### 2.2.1.2 Tampon et reactifs:

- Tampon PBS,
- Tampon de sensibilisation,
- Tampon de dilution des antigenes,
- Tampon de dilution du serum de detection et du conjuge,
- Solution chromogene ou OPD,
- Eau oxygenee,
- Solution d'acide sulfurique,
- Solution desinfectante,
- Solution de rouge de phenol,
- Solution d'azide,
- Solution de lavage des plaques,
- Serum de lapin anti 8 serotypes du virus de la FA (0, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1, SVDV) et du virus de la maladie vesiculeuse du porc,
- Serum de cobaye anti 8 serotypes du virus de la FA et du virus de la maladie vesiculeuse du porc,
- Serum de lapin anti immunoglobuline de cobaye conjuge a la peroxydase,
- Antigenes de reference (8 serotypes du virus de la FA et de la maladie vesiculeuse du porc),

### 222 Methodes:

2221 Sensibiliser les plaques de fixation (Coat fat bottomed Elisa plates):

- Preparer une dilution au 1/5000 du serum de lapin antiserotype dans le tampon de fixation a pH 9.6,
- Repartir 100 ul par cupule du serum de lapin dilue dans tous les cupule de la plaque,
- Placer les plaques a la temperature ambiante dans une atmosphere humide (ou chambre humide) pendant toute une nuit,

2222 Diluer l'antigene viral dans une plaque pour fixation du complement ou plaque de dilution (Round-bottomed CF-Carrier plates):

- Diluer la suspension antigenique de 1/2 en 1/2 avec du tampon **PBS Tween**:
- Repartir 50 ul de tampon **PBS Tween** dans tous les cupules
- Ajouter 50 **ul** de solution antigenique dans 50 **ul** de tampon **PBS Tween** pour obtenir la dilution 1/2 dans la colonne 1, ensuite 50 **ul** de la dilution au 1/2 dans les cupules de la colonne 2 pour une dilution au 1/4. ainsi de suite **jusqu'a** la dilution 1/4096 au niveau de la colonne 12),
- Ajouter 50 ul de tampon **PBS Tween** dans chaque cupule pour obtenir 100 **ul** dans chaque cupule de la plaque et doubler les **precedentes** dilutions, ainsi la dilution **sero** de 1/4 dans la colonne 1 et 1/8192 dans la colonne 12,
- Placer les plaques a **+4C** pendant une nuit et sous agitation,

2223 Transferer les dilutions antigeniques dans la plaque **Elisa**:

- Laver les plaques **Elisa** 3 fois avec du tampon **PBS**,
- Transferer les dilutions antigeniques, a raison de 50 ul par cupule, dans la plaque **Elisa**, en respectant l'ordre croissant des dilutions de 1/4 au 1/8192.
- Placer les plaques a **+37C** pendant une heure et sous agitation,

2224 Ajouter le serum de cobaye anti-serotype (Blocked Guinea pig anti-sera):

- Laver les plaques 3 fois avec du **tampon PBS**,
- Diluer le serum au 1/1000 (pour plaque: 5 **ul de serum dans** 5 ml de **PBS**),
- Repartir 50 ul du serum dilue dans chaque plaque du **serotype** correspondant 0, A, C,..
- Placer les plaques a **+37C** pendant une heure et sous agitation,

2225 Ajouter le conjugue (Blocked **conjugate**) dilue au 1/1000:

- **Laver** les plaques 3 fois avec du tampon **PBS**,
- Diluer le **cojuge** au 1/1000 (pour plaque: 5 ul de serum dans 5 **ml** de **PBS**),
- Repartir 50 ul du conjugue dilue dans toutes les plaques.
- Placer les plaques a **+37C** pendant une heure et sous agitation,

2226 Ajouter la solution de revelation OPD **activee** avec de l'eau oxygenee:

- Preparer une solution d'**OPD** avec une tablette d'**OPD** dans 55 ml de tampon Phosphate-Citrate,
- Preparer une solution au 1/2000 d'eau **oxygenee** avec de 1'**OPD**(pour une plaque : 2,5 ml dans 5 ml d'**OPD**),
- Distribuer 50 ul de cette solution dans chaque plaque en allant de la colonne 1 a 12,
- Placer les plaque8 a temperature ambiante pendant 15 mn (**Declencher** la minuterie au **debut** de la distribution de 1'**OPD**),

NB: Preparer un test du conjugue: 50 ul de conjugue avec 50 ul de solution OPD qui **entraîne** une coloration.

2227 **Arreter** la **reaction** avec de l'acide citrique a 1.5M:

- Ajouter 50 ul de la solution d'acide dans tous les cupules.

NB: Preparer une plaque **Temoin** (**Blank control plate**) : 50 ul de **OPD** avec 50 ul d'acide sulfurique a 1.5M.

2228 Lire a 492 nm:

- Etablir la DO de la plaque **temoin**,
- Lire les plaque% **Elisa** et Calculer les DO moyennes de chaque dilution,

2229 Etablir la courbe des DO:

- en **abscisse (X)**: Dilution **des** antigenes

- en ordonnees (Y): **Densites** optiques **moyennes**

22210 Choisir la dilution de **reaction** avec le test serologique:

- La dilution **optimale** antigenique se **situe** entre les DO de 1.0 a 1.5,

- **La** dilution **a** utiliser pour le test serologique est la moitie de la dilution optimale antigenique,

(VOIR EN ANNEXE: **LA MANIPULATION DU 5-6/05/1998**)

### 2.3 **Technique de detection des anticorps antiviruses de la F.A** par le test **Elisa**:

Elle permet de **detecter** les anticorps presents dans le serum des animaux vaccines ou ayant **survecu** a une infection naturelle par le virus de la fièvre aphteuse. Les anticorps sont **specifiques** du type de virus.

231 Matériels et **reactifs** utilises:

2311 Matériel.

Le materiel est identique a celui utilise pour la detection de l'antigene (liste en page).

2312 **Reactifs.**

- Rouge de phenol a 0.28,
- Solution de soude **a 1M,**
- Tampon de fixation (0.05 M Carbonate-bicarbonate ou Coating buffer) a **pH=9.6,**
- Tampon PBS **a** pH 7.2,
- Tampon de dilution **Elisa** (Tween et rouge de phenol),
- Tampon de revelation (Tampon PBS, **Tween** et Lait en poudre),
- Substrat (OPD dans tampon phosphate-citrate a pH **5.0**),
- Solution d'acide **d'arret** (acide sulphurique a **1.25M**),
- Solution **desinfectante,**

232 Methodes utilisees:

On utilise trois tests:

- Spot test: 40 serums sont testes par plaque,
- Minutitration: 10 serums sont testes par plaque,
- **Full** titration: 5 serums par plaque,

2321 Spot test

23211 Preparation des **temoins** et des echantillons de serums:

232111 Dilution des **temoins**:

On prepare les **temoins** suivants:

Temoin antigenes 0, A, C, **SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1;**

Temoin serum negatif 0, A, C, **SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1;**

Temoin serum faiblement Positif 0, A, C, **SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1;**

Temoin serum fortement Positif 0, A, C,, **SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1;**

Ces **temoins** sont utilises au **1/16** (10 ul dans 150 ul) et sont repartis dans une plaque de dilution **a** fond rond, **a** raison de 50 **ul** par cupule.

Pour chaque temoin, on utilise 4 **cupules** dans les colonnes 11 et 12.

La repartition est la suivante:

**Temoin** antigene: 11-12H et 11-12G

Temoin serum negatif: 11-12F et 11-12E

**Temoin** serum faible positif: 11-12D et 11-12C

Temoin serum fort **positif**: 11-12B et 11-12A

Pour le **temoin** antigene, on met 50 ul de tampon PBS-Tween a cote des dilutions de **1/6** des **temoins** serums.

232112 Dilution des serums

Les 40 serums sont dilues au **1/16** dans une plaque de dilution a fond rond (plaque de fixation de **complement**): 10 ul de serum dans 150 ul de tampon PBS.

Les 40 serums dilues sont repartis dans une **deuxieme** plaque de dilution, deux cupules par serum, a raison de 50 ul par cupule. Les serums sont repartis dans les colonnes 1 a 10 et les **rangees** A a H.

Le **schema** de repartition des 4 **temoins** et 40 **serums** sont **presentes** a la page xxx.

232113 Dilution de l'antigene.

chaque antigene 0, A, C, **SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1** est dilue selon le titre **defini** dans le test **precedent** titrage du virus.

Par exemple, pour les antigenes suivants:

- antigene 0 BFS: au **1/120**

(diluer pour 1 plaque 60 ul dans 7,2 ml de tampon)

- antigene A22: au **1/45**

(diluer pour 1 plaque 200 ul dans 9 ml de tampon)

- antigene C: au **1/100**

(diluer pour 1 plaque 50 ul dans 5 ml de tampon)

232114 **Melange** Serum-Antigene.

Ajouter 50 ul de l'antigene dilue (0, A, . ..) dans tous les cupules de la plaque de dilution contenant les 4 **temoins** et les 40 serums dilues.

Les plaques contenant le **melange** serum-antigene sont places a la temperature ambiante dans une chambre humide pendant *une* nuit.

**NB:** Chaque antigene doit etre **melange** a tous les serums dilues, donc **preparer** 7 plaques de **serums-temoins** dilues pour les 7 serotypes du virus de la fièvre aphteuse.

2322 Preparation des plaques sensibilisees:

Les plaques **Elisa** sont sensibilisees avec du serum de lapin **anti-serotype** du virus de la FA. Le serum de lapin, dilue au **1/5000** dans le tampon de fixation (a pH **9,6**), est repartit dans tous les cupules de la plaque a raison de 100 ul par cupule. Les plaques sont **placees** ensuite a la temperature de **+4 c** sous agitation.

**NB:** on sensibilise une plaque par **serotype**, soit 7 plaque pour les 7 serotypes du virus de la FA.

2323 Transfert du **melange** Serum-antigene dans les plaques sensibilisees:

23231 Laver les plaques sensibilisees 3 fois dans du tampon PBS,

23232 Transférer les 40 **melange serum-antigene** de la plaque FC a la plaque **Elisa**, en raison de 50 ul par **cupule** respectant l'ordre de repartition des cupules. De **meme**, transférer les 4 **temoins Ag,Negatif**, faible positif, fort positif.

23233 Incuber a 37C pendant 1 heure sous agitation.

2324 Addition du serum de cobaye antiserotype:

23241 Laver les plaques sensibilisees 3 fois dans du tampon PBS,

23242 Ajouter du serum de cobaye anti-serotype dilue au **1/1000,a** raison de 50 ul par cupule,

23243 Incuber a 37C pendant 1 heure sous agitation,

2325 Addition du **conjugue**(**serum** de lapin anti-cobaye conjugue a la peroxydase):

23251 Laver les plaques sensibilisees 3 fois dans du tampon PBS,

23252 Ajouter du conjugue dilue au **1/1000,a** raison de 50 ul par cupule,

23253 Incuber a **37C** pendant 1 heure sous agitation,

2326 Addition du **chromogene** OPD:

23261 Dissoudre 1 tablette **d'OPD** dans 55 ml de tampon **Phosphate-citrate**,

23262 Activer la solution avec **1/2000** d'eau *oxygenee*, cad 2.5 ul de H2O2 dans 5 ml de OPD,

23263 Ajouter la solution OPD-H2O2 dans tous les cupules , a raison de 50 ul par cupule,

23264 Laisser les plaques pendant 15 mn (**mettre** le **chronometre** en marche) a la **temperature ambiante**(les plaques sont sur la **paillasse** et a **l'obscurite**).

NB: - Tester le **conjugue** en melangeant dans deux cupules d'une plaque, 50 ul de conjugue et **50** ul de solution OPD-H202 pour voir apparaitre la coloration caracteriaque de la reaction enzymatique.

- Preparer la plaque **etalon** (Blank plate) en mettant 50 ul de **OPD-H202** dans les 8 cupules de la colonne 1(donc de **1A** a **1H**)

2327 **Arret** de la reaction enzymatique par une solution d'acide a **1.25M**:

23271 Ajouter 50 ul d'acide sulfurique a **1.25M** a tous les cupules au bout des 15 mn,

23272 Ajouter 50 ul d'acide a toua les cupules de la colonne 1 de la plaque **etalon**,

2328 Lire au **spectrophotometre** a la longueur d'onde de 492 nm:

23281 Lire la plaque **etalon**,

23282 Lire la ou les plaques de titrage de **serums**.

2329 Interpreter les resultats:

La valeur des Do indique l'intensite de la coloration et montre la prescne ou l'absence de reaation Anticorps-Antigene:

- Serum positif = DO faible

- Serum negatif = DO fort

**L'interpretation** des resultats est faite sur la valeur des pourcentages d'inhibition:

la valeur du Temoin Ag **permet** de verifier la qualite des **temoins serum** positif et negatif:

Le temoin fort positif doit etre superieur a 90 % d'inhibition par rapport au temoin Ag

Le **temoin** faible positif doit etre entre 50 a 90 % d'inhibition.

Le **tmoin** negatif doit etre inferieur a 50 % d'inhibition.

(VOIR FICHE DE **LECTURE** DE LA **MANIPULATION** DU 07 MAI 1998)

a.3 Technique de titrage des anticorps antivirux de la **F.A** par le test **Elisa** ou full titration:non **réalisé**

2.4 Technique de **caractérisation** d'une souche du virus de la **F.A** par le test **Elisa**:

241 **Répliquer** la souche virale isolée de l'animal (field strain) sur culture de lignée de **celllules** de rein de porc (Renal **Swine Cell** ou **RS cell**) ou de cellules BHK;

242 Récolter et Titrer le virus en utilisant une **gamme** de sérums anti **différentes** souches vaccinales du **même** sérotype. Ces souches vaccinales sont choisies en fonction de la xone **géographique** et du contexte **épidémiologique** (voir le protocole titrage de virus);

243 Choisir la combinaison **antigène/sérum** (**trapper/detector**) optimale et la dilution d'utilisation de la **souche vaccinale**. Cette dilution ne doit pas **être** inférieure à 1/6.

244 Titrer les sérums de 21 jours après vaccination (**par un** vaccin connu) contre la souche virale isolée et le vaccin homologue (Voir le protocole de titrage des sérums).

245 Déterminer le titre du **sérum**:

Calculer la DO moyenne de 24 **cupuples** de **témoin antigène**; Cette DO représente le maximum de DO obtenue avec ce test, cad 100 % de DO. Il faut diviser par 2 cette DO maximale pour **déterminer** 50% d'inhibition. Noter les cupule6 positifs lorsque la DO est

inférieure à 50% du **Témoin antigène** et les cupules négatifs lorsque la DO est supérieure à 50% de la DO du **témoin antigène**. Pour le calcul du titre du **sérum**, il faut se **référer** à la **méthode Karber**.

246 Calculer la Valeur relative ou R value:  
valeur **r** = titre du **sérum** avec la souche isolée **divisé** par le titre du **sérum** de souche virale de **référence**.

## 2.4 Technique de **détection** des anticorps **antivirus** de la **F.A** par le test de seroneutralisation:

Elle permet de **détecter** les anticorps neutralisants l'effet **cytopatogène** du virus de la FA sur une culture de cellules sensibles, **notamment** les cellules de **lignée** de rein de porc (cellules RS). Ces anticorps sont présents dans le serum des animaux vaccinés ou ayant **survécu** à une infection naturelle par le virus de la fièvre aphteuse. Les anticorps sont **spécifiques** du type de virus.

### 241: **Matériels & Méthodes**

#### 2411 **Matériels:**

L'**équipement** est le suivant:

Microscope **inversé**,  
Flacons de culture de cellules,  
Microplaque de culture de cellules,  
Micropipettes,  
Pipettes stériles,  
Flacons,  
**Cones**,  
Bain marie,  
Etuve

Les **Reactifs** chimiques sont:

**Désinfectant** (le **FAM**, eau de javel),

Les **réactifs** biologiques sont:

**Sérum de référence:** sérum d'animal convalescent

Milieu de culture **MEMG** à pH **7,4-7,6** à **+4°C** pendant 3 mois.

**Souche** virale du virus de la stomatite vésiculeuse bovine.

#### 2412 **Méthodes:**

- Choisir les plaques suivantes:

2 Plaques de Titration du **virus**(virus control)

2 Plaques de Titration du serum de **référence**

(serum **reference** control)

1 plaque de test des **échantillon** de **sérum**

- **Délimiter** des aones avec des marques sur les plaques:

Plaque de titration du virus:

tirer un trait **après** la **colonne** 9,

Plaque de controle du **sérum** de **référence:**

tirer trois traits pour delimitier les zones **:1-4;5-8**

et 9-12 (de A à H,

Plaque de controle des **échantillons** de **sérum:**

tirer trois traits pour **délimiter** les **zones:7-8;9-10**

et 11-12 pour le serum à tester

tirer trois traits pour délimiter les zones:

**A-B(3-4); C-D(3-4) et D-E(3-4)** pour le **sérum négatif**

tirer un trait pour délimiter la zone A-B(1-2)pour le

**témoin de toxicité**

Distribuer le diluant dans les plaques,:

Plaque de titration du virus:

mettre 50 ul dans tous les cupules de 1 à **9(A-H)**

mettre 150 ul dans le **témoin** diluant

mettre 100 ul dans le **témoin** cellules

Plaque de titration de serum:

mettre 50 ul dans tous les **cupules(sauf** ceux de la

**rangée H)**

Plaque de controle des échantillons de sérums:

mettre 50 ul de diluant **dans** les 2 cupules **2A-2B** pour

le controle de **toxicité**

mettre 25 ul de diluant dans les cupules **4A-4B** (ne

rien mettre dans **3A-3B)** pour les **témoins** sérums

négatifs

ajouter l'échantillon de **sérum prédilué** au 1/4: 50 ul dans les témoins de **toxicité 2A-2B**, 50 ul dans les cupules **3A-F** (dilution 1/8) et 25 ul dans les cupules **4A-F** (dilution 1/16)

diluer le **sérum** des vaccinés ou des convalescents: mettre 50 ul de diluant dans les cupules de B à H, à raison de 2 colonnes par **sérum**, ajouter 50 ul de sérum **décomplémenté** et **dilué** au 1/4 dans les cupules A et B diluer de B à H, ce qui donne les dilutions suivantes: **A:1/4, B:1/8, C:1/16, D:1/32, E:1/64, F:1/128, G:1/256, H:1/512**

Diluer et distribuer la solution virale: Diluer de **log<sub>10</sub>2,7** à **log<sub>10</sub>6,9** et distribuer 50 ul de la dilution la plus forte (**6,9 DICT50**) dans les 8 cupules de la colonne 9 et la dilution la plus faible (**2,7 DICT50**) dans les 8 cupules de la colonne 1, le schéma de distribution est le suivant:

Colonne1	:2,7	
Colonne2	:3,0	(0,3log 10)
Colonne3	:3,3	(0,3log 10)
Colonne4	:3,9	(0,6log 10)
Colonne5	:4,5	(0,6log 10)
Colonne6	:5,1	(0,6log 10)
Colonne7	:5,7	(0,6log 10)
Colonne8	:6,3	(0,6log 10)
Colonne9	:6,3	(0,6log 10)

NB:

(0,6log 10) est **égal** à la dilution au 1/4  
(0,3log 10) est **égal** à la dilution au 1/2

Distribuer les 3 dilutions virales de **2,7, 3,0** et **3,3** dans les 2 plaques de titrage de **sérums de référence** et les 2 plaques de titrage de **sérums** de vaccinés ou convalescents.

Incuber les plaques à 37°C pendant 45-75 mn.

Distribuer les cellules: 150 ul dans les cupules témoins cellules, 50 ul dans les autres cupules des 5 plaques (**virus, sérum de référence, sérum** de convalescent)

Incuber les plaques pendant 75 heures,

Lire les plaques: titre du virus sur la plaque de virus par la **méthode** de Karber, titre du **sérum de référence** sur les plaques de **sérum référence** (voir les annexes) titre du **sérum** des convalescents sur les plaques de **sérums de convalescents** (voir les annexes).  
**Interpréter:** les **sérums** sont **considérés** négatifs lorsque leur titre est inférieur ou égal à 1/11.

### III. TECHNIQUES GENETIQUES.

#### 3.1. Technique de Polymerase Chain Reaction.

##### 3.1.1 Extraction de l'ARN viral.

- Mettre 460 ul de l'échantillon dans un tube de 1,5 ml;
  - Ajouter un volume égal de tampon de lyse (vace 1% de B mercapto ethanol) à l'échantillon et mélanger au vortex;
  - Ajouter 460 ul d'éthanol a 70% et mélanger au vortex;
- Utiliser les colonnes de RNA (700 ul de volume max);  
Centrifuger a 10 000 rpm pendant 15 secondes;
- Laver avec 700 ul de tampon de lavage RWI avec centrifugation;
  - Laver avec 500 ul de tampon de lavage RPE avec centrifugation;
  - Laver avec 500 ul de tampon de lavage RPE avec centrifugation pendant 2 mn pour sécher la membrane;
  - Eluer le RNA avec 50 ul de DEPC-H2O dans un nouveau tube et centrifuger 10 000 rpm pendant 60 secondes;
  - Stocker a -20°C.

##### 3.1.2 Reverse Transcription de l'ARN viral.

- Mettre dans un tube de 0,75 ml le mélange suivant: dNTPs, 5XRT buffer, MMLV, RNasin, DEPC-H2O, Primer;
- Ajouter 11 ul de ce mélange a 14 ul de RNA viral pour obtenir un volume de 25 ul.
- Centrifuger;
- Chauffer a 42°C pendant 60 mn et puis 94°C pendant 10 mn;
- Stocker a -20°C.

##### 3.1.3 PCR Amplification du produit de la Reverse Transcription,

- Mettre dans un tube de 0,75 ml le mélange suivant: 25mMgCl2, 10mMdNTPs, 10Xbuffer, Primer1(10-25pmol/ul), primer2(10-25pmol/ul), Taq DNA polymerase(5U/ul), RT product, DEPC-H2O pour un volume total de 50 ul;
- Ajouter 20 ul d'huile minérale sur le mélange;
- Placer dans le thermocycleur avec le schéma suivant:  
94°C, 4mn, 1 cycle  
94°C, 60s, 30 cycles  
55°C, 60s, "  
72°C, 90s, "  
72°C, 5mn, 1 cycle
- Prendre 5 ul du produit PCR dans un gel d'agarose.

##### 3.2. Technique de Sequencage.

- Préparer tubes par souche de virus et marquer les tubes T,C,G et A;
  - Ajouter 1 ul de dd/dNTPs dans chaque tube selon l'ordre T,C,G et A;
  - Centrifuger rapidement;
  - Stocker à +4°C jusqu'à son utilisation;
- Pour chaque réaction, il faut ajouter dans des tubes le réactif suivant:

template DNA=	3 ul
5xsequencing buffer=	4 ul
32py ATP labelled primer=	1,5 ul
sequencing grade Taq polymerase(5U/ul)=	1 ul
DEPC-h2o=	10,5 ul

- Mélanger et centrifuger;
- Ajouter 4 ul du mélange de chaque dd/dNTP;
- Centrifuger;

- Ajouter **une** goutte d'huile mintralt;
- Mettre dans un thermocycleur à **94°C**;
- **réaliser** le **programme** suivant:
 

<b>94°C</b>	2mn	1 cycle
<b>92°C</b>	<b>1 mn</b>	
<b>55°C</b>	<b>1 mn</b>	<b>30 cycles</b>
<b>72°C</b>	<b>1 mn 30 s</b>	
<b>20°C</b>	hold	1 cycle
- Ajouter 4 ul de solution **d'arrêt** dans chaque tube,
- Centrifuger
- Chauffer à **80-90°C** avant de **déposer dans** le gel,
- Mettre **2,5-2,5 ul** dans chaque puits;
- Mettre un courant de 70 watts pendant 2 heures ou 4 heures;
- Retirer le gel et le faire **sécher** (1,5 heures à 80-85 °C);
- Exposer le gel à un film (48 heures à **-70°C**)
- Développer le film et lire Selon l'ordre **T,C,G** et A.

#### IV. BIBLIOGRAPHIE:

- 1 Reynolds **Christine**.- Tissue Culture (Techniques des **cutures** de cellules) .Document technique du Laboratoire de Reference Mondial pour la fièvre aphteuse, Pirbright, **May** 1998, 21 pages.
- 2 **Ferris Nigel**.- Foot and Mouth Disease and **Swine** vesicular Diseasee Virus **Diaagnosis.A** Manual of Operations. Document technique du Laboratoire de Reference Mondial pour la fièvre aphteuse, Pirbright, January 1998, 43 pages.
- 3 **David.J.Rowlands**. - Foot and Mouth Disease **Viruses**. in Encyclopedia of Virology, 1994, pp 488-496.
- 4 **Ferris Nigel**.- **Procedure** for producing inactivated, purified **FMD 146S antigens.A** Manual of Operations. Document technique du Laboratoire de Reference Mondial pour la fièvre aphteuse, Pirbright, January 1998, 2 pages.
- 5 **Ferris Nigel**.- **WRL procedure** for producing **FMD** anti-1466 sera. A Manual of Operations. Document technique du Laboratoire de Reference Mondial pour la fièvre aphteuse, Pirbright, January 1998, 2 pages.
- 6 **Telli Rendle**.- **Foot** and Mouth Disease Antibody Detection: **Elisa** Manual. A Manual of Operations. Document technique du Laboratoire de Reference Mondial pour la fièvre aphteuse, Pirbright, January **1998,10** pages.
- 7 **D.J.K Mackay,R.P.Kitching** and **R.M Armstrong**.- Detection of antibodies against vesicular and related **viruses** by the virus neutralisation test (**VNT**). **Standard** Operating Prodedure (**SOP**), Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, **May** 1998, 17 pages.

## V. ANNEXES:

5.1 Resultats des tests de **detection** des **antigenes** (densites optiques):

5.1.1 Fiche d'analyse du 28 Avril 1998:

Plaque I: NF

- hntigenes de **Reference=**

Faibles eu **D.O** en Type 0:

1.791 au 1/5,

0.569 au 1/25,

0.112 au 1/125

(DENSITES OPTIQUES FAIBLES)

- Echantillon N **1:Iran 27/95**

(suspension originale)= **POSITIF** en 0 avec **D.O moyenne** de 0,695

**0.715+0.872+0.683/3 = 0.756**

0.756 - 0.060 (**controle** negatif ) = 0.696

- Echantillon **N2: Saudia 7/92**

(suspension **originale**):(**NEGATIF**) avec des D 0 < 0.1

Plaque II: Y

- hntigenes de **Reference=** Corrects en **D.O**

**Type 0 :**

1.304 (au 1/5),

0.631 (1/25),

0.225 (1/125)

**Type A :**

2.175 (au 1/5),

1.211 (au 1/25),

0.398 (au 1/125)

- Echantillon N **1:Iran 27/95**

(**BTY1**):**POSITIF** en type 0:

avec denaite optique moyenne 1.469

- Echantillon N2: Saudia **7/92**

(**BTY1**):**POSITIF** en type A: avec densite optique moyenne 0,922

5.1.2 Fiche d'analyse du 29 Avril 1998:

Plaque N:l Y

- Antigenes de **reference:**

Faibles en **D.O** en type 0

0.360 (au 1/5),

0.167 (au 1/25),

- 0.013 (1/125)

Echantillon **N1:**

- Kuwait **48/94** (Original suspension,) **POSITIF** en type 0, avec optique moyenne de 0.500

5.1.3 Fiche d'analyse du 30 Avril 1998:

Plaque NI:Y

Antigene de reference: avec D 0 faibles en type 0 de:

0.393 (au 1/5),  
0.019 (au 1/25),  
0.049 (au 1/125).

**Echantillon N1:**

Kuwait 48/94 **BTY1:** POSITIF en type 0 avec **densite** optique moyenne de 0.489

Plaque **NII:Y**

**Antigene** de reference: avec D 0 **correctes** :

en type 0:

1.66 (au 1/5),  
0.77 (1/25)  
et 0.29(1/125)

en type C:

1.64 (au 1/5),  
0.75 (1/25)  
et 0.26 (au 1/125)

**Echantillon N1:**

Kuwait 48/94 **BTY1:** POSITIF en type 0 avec densite optique moyenne de 1.51

**Echantillon N2:**

C3 Chaco Parc 74 BHK3: POSITIF en type C avec densite optique moyenne de 1.47

5.1.4 Fiche d'analyse du 1 Mai. 1998:

Plaque NI:Y

Antigenes de reference:

avec des densites optiques correctes de:

1.24 (au 1/5),  
0.89 (1/25)  
et 0.19 (1/125) en type 0

**Echantillon N1**

Kuwait 48/94 RS: POSITIF en type 0 avec une densite **moyenne** de 0.96

**Echantillon NII**

Cam 8/94 **BTY1:** POSITIF en 0 avec une densite moyenne de 1,216

5.2. Resultats du titrage du virus de la **F.A**

5.2.1 Fiche d'analyse du 5-6/05/1998:

**Echantillon N1:** Antigene 0 **BFS** **Densites** optique8 moyenne8  
obtenues aux dilutions suivante&:

Colonne 1:1/4	2.22
Colonne 2:1/8	2.22
Colonne 3:1/16	2.21
Colonne 4:1/32	2.19
Colonne 5:1/64	2.24
Colonne 6:1/128	2.18
Colonne 7:1/256	2.13
Colonne 8:1/512	1.50
Colonne 9:1/1024	1.09
Colonne 10:1/2048	0.57
Colonne 11:1/4096	0.35
Colonne 12:1/8192	5.22

La **dilution antigenique** optimale est de 1/512 correspondant a la densite optique de 1.5. La **dilution** a utiliser est de 1/256, cad la roitie de 1/512.

5.3 Resultats du titrage (Spot test) des serums du 07/05/1998 en **presence** de l'antigene 0 BFS.

- Echantillons: 45 serums,

- Temin antigene: antigene **OBFS**,
- Temin serum fort positif anti-0,
- Temoin serum faible positif anti-0,
- Temoin negatif,

La Valeur obtenue en 100% en DO : **1.28** (valeur donnee par le spectrophotometre).

La Valeur obtenue en DO des **Temoins**:

Temoin antiaene **OBFS**(dilué au 1/16):

**1,74; 1,68; 1,87; 1,80**

permet de calculer la valeur DO 100 % d'inhibition qui est egale a  $1,74+1,8 = 3,54/2 = 1,77$  (**ecarter** les 2 valeurs **extremes** **1,87** et **1,68**). Elle permet d'**interpreter** les resultats: Un serum est dit positif lorsque le pourcentage d'inhibition est superieur a 50% et il est dit negatif lorsque le pourcentage est inferieur a 50%.

Temin serum fort positif **anti-O**(dilué au 1/16):

**0,06(97%); 0,08(96%); 0,05(97%); 0,06(97%).**

Le **temoin** positif est correct car tous les pourcentages d'inhibition sont **superieurs** a 90%.

Temoin serum faible positif **anti-O**(dilué au 1/16):

**0,21(88%); 0,27(85%); 0,22(87%); 0,26(86%)**

La DO du serum faible positif est correcte elle est situee entre 50% et 90%.

Temoin serum **negatif**(dilué au 1/16):

**1,25(29%); 1,29(27%); 1,19(33%); 1,27(28%)**

La DO est **correcte** car elle est inferieure a 50% d'inhibition.

La valeur obtenue en DO des 40 **echantillons de serums**(dilués au 1/16):

31: **1,3(26%) ET 1,15(35%)**

**S1** est negatif car les DO sont < a 50% d'inhibition.

**S2: 0,84(53%) ET 0,71(60%)**

**S2** est positif car les DO sont > a 50% d'inhibition.

Les autres serums positifs en anticorps anti **Type 0** sont au nombre de 12: **S3(65%); S5(51%); S15(92%); S16(67%); S17(91%); S21(65%); S22(84%); S23(56%); S24(66%); S25(69%); S31(90%) et S36(76%).**

#### 5.4 **Resultats** du titrage (Spot test) des **serums** du **07/05/1998** en **presence de l'antigene A22**.

- Echantillons: 40 serums,
- Temin antigene: antigene **A22**,
- Temoin serum fort positif anti-A22,
- Temoin serum faible positif anti-A22,
- Temoin negatif,

La valeur des DO des **temoins** est de:

Temin antiaene **A22**(dilué au 1/16):

**2,04+2,08=2,12:2=2,06**

Cette valeur **2,06** correspond a 100 % de densite optique.

Un serum est positif lorsque le % d'inhibition est superieur a 50%. **Au contraire**, il est **negatif** lorsque le % d'inhibition est inferieur a 50%.

Temoin serum **negatif**(dilué au 1/16):

**1,86(10%); 1,77(14%); 1,79(13%); 1,85(10%)**

Les % d'inhibition sont corrects car sont inferieurs a 50%.

Temoin serum faiblement positif(dilué au 1/16):

**0,69(66%); 0,53(74%); 0,63(69%); 0,55(73%)**

Les % d'inhibition sont corrects car sont situes entre a 50% et 90%.

Temoin serum fortement positif(dilué au 1/16):

**0,43(79%); 0,47(77%); 0,49(76%); 0,43(79%)**

Les % d'inhibition sont trop faibles pour un temoin fort positif et sont inferieurs a 90%.

**40 Serums a tester(dilués au 1/16):**

Les **serums** positifs en anticorps anti Type **A22** sont ceux dont le % d'inhibition est superieurs a 50% sont au nombre de quatre: **S15(53%); S16(90%); S23(86%); S35(71%)**.

5.5 **Resultats** du titrage (Spot test) des serums du **07/05/1998** en presence de l'antigene **c**.

- **Echantillons:** 40 serums,
- **Temoin** antigene: antigene C,
- Temoin serum **fort positif** anti-C,
- **Temoin** serum faible positif anti-C,
- Temoin negatif,

La valeur des DO des **temoins** est de:

**Temoin antigene(dilué au 1/16):**

**2,01; 2,02** permet la DO 100 % d'inhibition =  $2,01+2,02=4,03/2$  # **2,02**

NB: on peut egalement calculer le seuil de **positivite** qui est egal a  $2,02/2=1,01$ . les **serums** positifs sont ceux dont les valeurs de DO sont inferieures a **1,01**. Ce sont les six serums suivants: **S3(0,22 et 0,22); S5(0,57 et 0,59); S14(0,97 et 0,83); S29(0,42 et 0,35); S30(0,19 et 0,18); S33(0,87 et 0,74)**.

**Temoin serum negatif en C(dilué au 1/16):**

ont des % d'inhibition de 6%; 35%; 42% et 4% **corrects** car ils sont inferieurs a 50%.

**Temoin serum faiblement positif en C(dilué au 1/16):**

ont des % d'inhibition de **52%;44%;53%** et sont situes entre 50 et **90%**.

**Temoin serum fortement positif en C(dilué au 1/16):**

ont des % d'inhibition de 93%; 93%; 95% et 93% sont superieurs a 90%.

**40 serums a tester en anticorps anti-c(dilués au 1/16):**

Les serums positifs sont ceux dont le % d'inhibition est **superieur** a 50%. Ces serums sont les 6 **serums S3(90%); S5(71%); S14(55%); S29(81%); S30(90%); S33(60%)**.

5.6 **Resultats** du titrage (FULL test) des serums du **08/05/1998** en presence de l'antigene **O** BFS.

- **Echantillons:** 5 serums positifs en O(dilué au 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/512, 1/1024 et 1/2048)
- Temoin antigene: antigene **OBFS(dilué au 1/16)**,
- **Temoin** serum fort positif **anti-O(dilué au 1/16)**,
- Temoin **serum** faible positif **anti-O(dilué au 1/16)**,
- Temoin negatif(dilué au 1/16),

La valeur des DO des **temoins** est de:

**Temoin antigene:**

**2,13; 2,04** permet la DO 100 % d'inhibition =  $2,13+2,04=4,17/2$  # **2,08** correspond a la valeur 100% de **D.o** pour le calcul de % d'inhibition.

NB: on **peut** calculer les seuil de positivite des **serums** (Thresold):  $2,08/2=1,04$ . Les serums positifs ont des DO inferieurs au seuil de positivité **1,04**.

**Temoin serum negatif en O:**

2%; 11%; 7%; 41% sont **corects** car ils sont inferieurs a 50%

**Temoin serum faiblement positif en O:**

66%; 80%; 63%; 63% sont des DO **corectes** car situees netre 50 et 90 % d'inhibition.

**Temoin fortement positif en O:**

91%; 91%; 92%; 92% sont corrects car superieurs a 90%.

**Titre des 5 serums:**

les serums ont ete dilues au 1/16; 1/32; 1/64; 1/128; 1/256; 1/512; 1/1024 et 1/2048.

Les titres obtenus sont : **S1= 1/22; S2<16; S3=1/22; s4=1/448; s5= 1/64.** (Conférer l'Appendix 2 titres selon la méthode Karber de sérums dilués en 2 cupules).

Interpretation des resultats:

Un serum est dit positif de **facon** apecifique lorsque le titre est > 45.

Le serum est dit protecteur lorsque le titre est > 100. Alors les animaux presentant ces taux d'anticorps sont dits proteges.

**5.7 Resultats du titrage (FULL test) des serums du 13/05/1998 en presence de l'antigene 0 BFS.**

- Echantillons: 5 serums positifs en O (Spot test)
- Temin antigene: antigene **OBFS**,
- **Temoin serum fort** positif anti-0,
- **Temoin** serum faible positif anti-0,
- **Temoin** negatif,

La valeur des DO des **temoins** est de:

Temoin antiaene 0

2,07; 2,09 permet de calculer la valeur 100% DO:  
 $2,07+2,09=4,16/2=2,08$ .

**NB:** le seuil de positivite en DO est  $2,08/2=1,04$ . Les serums dont la DO moyenne est inferieure a 1,04 sont dits positifs, au contraire lorsque la Do est **superieur** a 1,04, le serum est **negatif**. Ainsi les titres des serums sont les suivants: **S1: DO 1,01** a la dilution 1/1024 donc titre est egal a 1448; **S2=724; S3=45; s4=181** et **s5<16**.

Temoin serum nesatif:

6%; 7%; 1% et 3% ont des pourcentages corrects car Inferieurs a 50% d'inhibition,

Temin serum faiblement positif:

64%; 71%; 68%; 69% sont corrects car situes netre 50 et 90% d'inhibition.

Temoin serum fortement positif:

94%; 94%; 94% et 95% sont corrects car **superieurs** a 90% d'inhibition.

Titre des 5 serums testes:

Le serum est positif aux dilutions dont le % d'inhibition est superier a 50%. Ainsi, le serum 1 est positif jusq'a la dilution 1024 d'ou le titre 1448. Les autres serums ont les titres suivants: **S2=724; S3=45; s4=181; s5<16**.

**5.8 Resultats de la caracterisation d'une souche du virus de la fievre aphteuse du 14/05/1998.**

5.8.1 Titrage de la souche virale de type 0 avec les **antiserums** de reference 0 **BFS**; 0 **Manisa** et 0 Hong Kong,

Le virus est dilue de 2 en 2 de 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32; 1/64; 1/128 et 1/256. Le titre du virus est a la valeur de DO entre 1 et 1,5.

Titre avec 0 BFS: 32 (les DO sont de 1,12; 1,29; 1,41; 1,42 a la dilution 1/32) donc le virus peut etre utilise en titrage de serum a la dilution 1/16 cad 32/2.

Titre avec 0 **Manisa**: 32 (les Do sont de 1,33; 1,33; 1,34 et 1,28 a la dilution de 1/32) donc le virus peut etre utilise en titrage de serum a la dilution 1/16 cad 32/2.

Titre avec 0 Hong Kong: 64 (les Do sont de 1,42; 1,40; 1,25 et 1,23 a la dilution de 1/64) donc le virus peut etre utilise en titrage de serum a la dilution 1/32 cad 64/2.

5.8.2 **Caracterisation** de la souche virale avec le serum de reference.

- Souche vaccinale,
- Souche virale a **caracteriser**
- **Serum** de reference

La moyenne des **Densites** optiques avec 24 **cupules** contenant la souche **vaccinale: 1,17+1,27=2,44/2=1,22** permet de calculer le seuil de positivite **1,22/2=0,61** pour le titrage du serum de **reference.**

Le titre du serum est obtenu par la dilution qui donne une moyenne de DO = ou le plus proche de la DO de **0,61**, dans ce cas, **il s'agit** de la dilution **1/4096** dont les DO sont **0,55+0,51=1,06/2=0,53.**

La **moyenne** des densites optiques avec 24 cupules contenant la souche virale a caracteriaer: **0,98+0,95=0,96** pour un seuil de positivite de **0,96/2=0,48.**

Le titre est donne par la dilution de **1/8192** dont la DO moyenne est de **0,47+0,53=0,5.**

La **R** value est de **4096/8192=0,5.**

5.8.3 Interpretation:

La **R** value **<0,2** signifie que le vaccin ne protege pas contre la souche isolee.

La **r** value **=1** signifie que le vaccin protege bien.

5.9: **APPENDIX SELON LA METHODE DE KARBEN: CALCUL D15 TITRE DE SERUMS OBTENUS PAR LA FULL TEST :**

Rangée A	Rangée B	Rangée C	Rangée D	Rangée E	Rangée F	Rangée G	Rangée H	Dilut° TITRE=
1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	
t						-	-	
						-	-	1/16
+						-	-	1/22
t	+					-	-	1/32
+	t					-	-	1/45
+	t	+				-	-	1/64
+	t	+				-	-	1/90
t	t	+	t			-	-	1/128
+	t	+	t			-	-	1/181
t	t	+	t	t		-	-	1/256
+	t	+	t	+		-	-	1/362
t	+	+	t	+	+	-	-	1/512
+	t	+	t	t	-	-	-	1/724
t	t	+	+	+	+	-	-	1/1024
+	t	+	t	+	+	+	-	1/1448
t	t	+	t	+	+	+	+	1/2048
t	t	+	t	+	+	+	-	

5.10: Test de **séronéutralisation** du virus de la fibre aphteuse  
( **Game** de dilutions du virus).

Dilutions de virus	Volume (en ml)		
	Virus	Diluant	Total
<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>0,5</b>	<b>4,5</b>	<b>5,0</b>
10 <sup>-2</sup>	<b>0,5</b>	<b>4,5</b>	<b>5,0</b>
10 <sup>-3</sup>	1,5	13,5	15,0
<b>10<sup>-3,3</sup></b>	6	6	12,0
<b>10<sup>-3,6</sup></b>	5	5	<b>10,0</b>
<b>10<sup>-4,2</sup></b>	1	3	<b>4,0</b>
<b>10<sup>-4,8</sup></b>	1	3	<b>4,0</b>
<b>10<sup>-5,4</sup></b>	1	3	<b>4,0</b>
10 <sup>-6</sup>	1	3	<b>4,0</b>
<b>10<sup>-6,6</sup></b>	1	3	<b>4,0</b>
<b>10<sup>-7,2</sup></b>	<b>1</b>	3	<b>4,0</b>

Exemple de lecture:

<b>10<sup>-1</sup></b>	=	100%	(16 sur 16)
<b>10<sup>-2</sup></b>	=	100%	(16 sur 16)
<b>10<sup>-3</sup></b>	=	100%	(16 sur 16)
<b>10<sup>-3,3</sup></b>	=	100%	(16 sur 16)
<b>10<sup>-3,6</sup></b>	=	50%	(08 sur 16)
<b>10<sup>-4,2</sup></b>	=	0%	(00 sur 16)

Le titre est de **10<sup>-3,3+0,6</sup> = 10<sup>-3,9</sup>**.

**NB:** le nombre **0,6** correspond à 8 cupules avec ECP sur 16 cupules inoculés.

5.11: Test de séroneutralisation du virus de la **fièvre** aphteuse  
 (**Gamme** de lecture de Titration du virus: 2 plaques de **8** cupules par  
 dilution soit soit 16 cupules pour les 2 plaques).

Nombre de cupules <b>positifs</b> sur les 16 inoculés	Fraction ' ajoutée: à la dernière dilution avec <b>100%</b> ECP
0/16	0,30
<b>1/16</b>	<b>0,34</b>
<b>2/16</b>	<b>0,38</b>
3/16	<b>0,41</b>
<b>4/16</b>	<b>0,48</b>
<b>5/16</b>	<b>0,49</b>
<b>6/16</b>	<b>0,53</b>
<b>7/16</b>	<b>0,56</b>
<b>8/16</b>	<b>0,60</b>
<b>9/16</b>	<b>0,64</b>
<b>10/16</b>	<b>0,68</b>
<b>11/16</b>	<b>0,71</b>
<b>12/16</b>	<b>0,75</b>
<b>13/16</b>	<b>0,79</b>
<b>14/16</b>	<b>0,83</b>
<b>15/16</b>	<b>0,86</b>
<b>16/16</b>	0,90

## **VI. REMERCIEMENTS:**

Dr **A. I. Donaldson**, Directeur du Laboratoire de Pirbright.

Dr R.P. **Kitching**, Directeur du Laboratoire de Reference Mondial pour la fièvre aphteuse,

Dr D. **Mackay**, Directeur du Laboratoire de Reference de la **Communaute** pour la **fièvre** aphteuse.

Dr **Nigel Ferris**, Chercheur au Laboratoire de Reference Mondial pour la fièvre aphteuse.

**Mr** Jef, Technicien au Laboratoire de Reference pour la fièvre aphteuse,

**Mrs** Christine Reynolds, Responsable des cultures de cellules au Laboratoire de Reference Mondial pour la fièvre aphteuse.

**R.M** Armstrong, Responsable de la seroneutralisation au Laboratoire de Reference Mondial pour la fièvre aphteuse.

Teli. **Rendle**, Responsable des tests serologiques au Laboratoire de Reference Mondial pour la **fièvre** aphteuse.

**Linda** Turner, Technicienne au Laboratoire de Reference Mondial pour la fièvre aphteuse.

Anne **Gardner**, technicienne au Laboratoire de Reference Mondial pour la fièvre aphteuse.