



Institut Sénégalais de
Recherches Agricoles

Laboratoire National d'Élevage
et de recherches vétérinaires
BP 2057 Dakar-Hann
Tel: 221832 36 781832 36 79
Fax: 221832 21 18
Email: lnerv@syfed.refer.sn

16 01

2000-1601

Organisation des Nations Unies
pour l'Agriculture et
l'Alimentation.

F.A.O

RAPPORT DE MISSION
au Centre National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires de Nouakchott
du 12/07 au 02/08/1999



Par Dr **Yaya Thiongane**

Consultant International (TCDC) pour le diagnostic de laboratoire de la fièvre de la vallée du Rift

TCP/MAU/8923(E)

Ref: 010/Path. An.

Août 1999

1. Introduction:

La fièvre de la vallée du Rift (FVR) est une **maladie virale**, commune à l'homme et aux **animaux**, transmise par les **moustiques (arbovirose)**. **Présente** essentiellement jusqu'ici sur le continent africain elle est **classée** Parmi par les maladies **émergentes** et son impact économique et social est important

Décrite en 1912-1913, pour la **première** fois, la **FVR** est signalée comme une hépatite **nécrosante** qui touche **particulièrement** les élevages de **ruminants** domestiques (les ovins, les caprins et les bovins) de la vallée du **Rift** au Kenya. Seuls quelques cas de fièvre grippale seront rapportés dans la population humaine vivant dans la **zone** d'enzootie.

En **1977-1978**, la **FVR**, **sous une** forme **d'épizootie-épidémie très meurtrière**, frappe la zone du Delta du Nil, en Egypte. Elle touche **25 à 50 %** des troupeaux de **ruminants** domestiques. Lors de ce foyer, on **dénombr**a Plus de 200 000 cas humains avec, au moins, 600 morts. Les modifications **écologiques consécutives** à la mise en **service** du barrage **d'Assouan (extension** des **périmètres** irrigués, multiplication des sites favorables aux **moustiques**, **afflux d'animaux** sensibles) seraient **à l'origine** de cette épidémie dans cette partie de l'Afrique, jusque là indemne.

Depuis lors, la **FVR** est classée parmi les maladies de la liste A de l'**Office International des Epizooties (O.I.E.)**.

En conséquence, les pays doivent suivre les règles du code zoo-sanitaire pour sa déclaration et son contrôle.

De plus, elle **intéresse** l'Organisation Mondiale de la **Santé (OMS)** car elle fait partie de huit **fièvres** hémorragiques virales humaines qui sont **d'actualité** dans le Monde. De nombreux foyers ont été signalés ces dernières **années** à travers le continent : en Mauritanie-Sénégal en 1987, à Madagascar en 1991, au **Kenya-Somalie** en 1997-1998 et de nouveau en Mauritanie, **très récemment**, en 1998.

En Afrique de l'Ouest, l'épizootie-épidémie de Mauritanie-Sénégal de 1987 fut la Première **décrite** dans la Basse vallée du **fleuve**. Elle s'est **manifestée** par un taux élevé (**70 à 80%**) d'avortements des femelles gravides (brebis, **chèvres** et vaches), une forte **mortalité (90-100%)** des jeunes animaux (**agneaux**, chevreaux et veaux). Pour les animaux adultes, l'infection virale entraîne la mort (30%) ou un **dépérissement** (animal sans valeur économique) **résultant** des desordres **hépatiques** et de l'ictère. Les populations d'éleveurs, vivant au contact des animaux malades, ont été les plus **touchées** avec 1500 cas et plus de 200 décès. Parmi les causes expliquant l'apparition de la FVR, on cite les facteurs suivants : la mise en eau du barrage anti sel de **Diam**a sur le fleuve Sénégal, la concentration animale et humaine dans les pâturages le long du fleuve, l'extension des **périmètres** irrigués et la **présence** d'eau douce pendant toute l'**année** dans les principaux marigots de la zone qui favorisent le développement des moustiques vecteurs du virus.

Depuis cet épisode, les études menées dans les trois pays riverains du fleuve Sénégal (le Mali, la Mauritanie et le **Sénégal**) ont montré que la FVR s'est définitivement installée dans le Bassin du fleuve Sénégal et constitue une menace permanente pour le cheptel mais aussi pour les hommes dans les zones **où** les conditions **écologiques** favorisent la **pullulation** des moustiques vecteurs de la maladie.

Le foyer de FVR survenu en **Septembre-Décembre** 1998 dans le **sud-est** de la Mauritanie corrobore ce point de vue. Il a concerné **à la fois** les animaux (avortements chez les petits ruminants, les bovins et les dromadaires) et les hommes (6 décès à l'hôpital de Aioun) dans les **régions** de **Hodh el garbi**, **Assaba** et de **Brakna**. Cette ré-émergence de la FVR rend urgent la prise de mesures de lutte pour **contrôler** la maladie en Mauritanie et **éviter** son extension **à la faveur** des mouvements d'animaux (de type commercial et traditionnel) entre les 3 **pays** du Bassin du fleuve Sénégal (le Mali, la Mauritanie et le Sénégal).

La **FAO sollicitée**, a **mis** en place **un** programme d'appui (**TCP / MAU / 8923 E**) en Mauritanie avec comme objectifs, entre autres, le renforcement des capacités de diagnostic de la FVR du Centre National de l'**Élevage** et de **Recherches Vétérinaires (C.N.E.R.V)** de Nouakchott pour que le diagnostic **sérologique** et **virologique** de la **FVR** puisse se faire à Nouakchott et éviter de perdre un temps précieux pour acheminer les **prélèvements vers un** laboratoire **extérieur**.

Notre mission s'est **attachée** à évaluer la situation actuelle (activités, personnel, équipements, **locaux**), **déterminer** les **moyens nécessaires** aux techniques de diagnostic de la FVR utilisables au niveau du laboratoire de virologie (**Annexe 1**) **d'une part** et **d'autre part**, à démarrer des tests simples de diagnostic de la **FVR** pour une prise en charge effective de l'analyse de **prélèvements** provenant de l'activité de la surveillance pendant la **présente** saison des pluies.

2. Considérations générales:

2.1. Le Centre National de l'**Élevage** et de Recherches Vétérinaires (**CNERV**) de Nouakchott est créé en 1974 et est le laboratoire national chargé de la Recherche **Vétérinaire** et Zootechnique en Mauritanie. Il est placé sous la tutelle du Ministère du **Développement Rural** et de l'**Environnement (M.D.R.E.)**. Sa première mission est d'assurer un appui **aux** actions de protection de la **santé** des troupeaux en menant des **activités** de diagnostic, des **études épidémiologiques** et en proposant des moyens de lutte des maladies prioritaires enzootiques, nouvelles ou ré-émergentes.

Parmi les maladies prioritaires, la FVR occupe une place importante comme en témoignent les nombreuses études menées par le CNERV depuis 1985, notamment :

- Enquête **sérologique** sur les avortements infectieux des petits ruminants en Mauritanie en 1985 (article prévoyant le foyer de FVR de 1987)
- **Epidémiosurveillance** de la FVR en 1988 et 1989
- Essai en station et sur le terrain de vaccin (**MVP12** et Smithbum) contre la FVR en 1988-1989.

Ces études ont été menées **grâce à la coopération** internationale (convention CIRAD /EMVT, FAO) et sous régionale (Institut Pasteur de Dakar et LNERV de **Dakar/Hann** pour les analyses de laboratoire).

2.2. Le service de pathologie **infectieuse** qui **résulte** d'une **fusion récente** entre les services de **bactériologie** et de virologie a la charge du diagnostic des maladies virales. En 1998, ses **activités** ont concerné la **sérosurveillance** de la peste bovine (analyse par le test **Elisa-compétition** de 3833 **sérums** avec 1513 positifs, soit **39,4%** de **séropositivité**), le diagnostic de la rage (15 **prélèvements** analysés par test IF avec 09 positifs), la fièvre aphteuse (virus de type A confirmé par le laboratoire de Pirbright en Angleterre sur des **prélèvements envoyés** par le CNERV), la **séro-surveillance** de la FVR (245 **sérums** d'animaux du foyer de FVR de 1998 en cours d'analyse à l'Institut Pasteur de Dakar). Le service dispose d'un équipement qui a permis d'isoler sur **cultures** de cellules des souches de la variole du dromadaire qui constituent présentement sa banque de virus.

2.3. Le Dr Yaghouba. Kane, Chef de service, depuis janvier 1998, participe, avec 2-3 techniciens (Annexe 5), à la campagne de surveillance de la **FVR** par le suivi virologique, **sérologique** et clinique de troupeaux de **ruminants** sentinelles. Après l'épisode de FVR de 1998, **une 1^{re}** mission de **prélèvements** (du 13 au **25/06/1999**) a permis de récolter 310 **sérums** des 9 troupeaux d'animaux sentinelles repartis dans les zones **considérées** à risque.

Une seconde mission de surveillance est en cours lors de notre mission (du **2/07** au **05/08/1999**) doit apporter un nombre équivalent de **sérums**.

De plus, une mission conjointe avec les entomologistes de l'**IRD** de Dakar, prévue en Août 1999, doit visiter le foyer de FVR de 1998 et permettre d'évaluer l'**activité** du virus FVR (**prévalence** en anticorps **IgG/IgM**, isolement de virus d'animaux et de pools de moustiques) pendant la présente saison des pluies dans le sud est de la Mauritanie.

Localisation des troupeaux sentinelles en 1999.

Régions	N° troupeau/Site	Agent vétérinaire	Nbre de sérums récoltés (mission du 13-25/06/1999)
Hodh el Garbi	1/Wouguiss	Wone T	40
	2/Qarqara	Gaye S	30
Assaba	3/Worti	Ba A.S	30
	4/Agoumamine I (kankossa)	Sall H.A	31
Gorgol	5/Moudaikhoul jeddah (wourq bathiourou)	Samake D	39
Brakna	6/Saradogou	Sarr A..N	40
	7/Lac Aleg	Baguily O.L	30
Trarza	8/Douze-douze	Thioune S	40
	9/Rosso	Diarra B	30
Total :			310

6

Notons que ces localisations concernent les zones où la FVR a sévi en 1998 mais aussi une partie des zones de l'enquête **sérologique** menée en 1996-1997 chez 1077 petits **ruminants** dans six wilayas (ou régions). De plus, nous constatons que la région de Guidimakha n'est pas concernée par la présente surveillance bien qu'elle soit frontalière **avec** le Mali et le Sénégal et qu'elle fasse partie du Bassin du fleuve **Sénégal**.

2.4. En Mauritanie, le **système** national de surveillance de la **FVR** implique, en **plus** du CNERV, plusieurs autres partenaires comme la Direction de Ressources **AgroPastorales (D.R.A.P)**, le Réseau Mauritanien d'**Epidémiologie** des Maladies Animales (**REMEMA**) pour la surveillance de la FVR par les troupeaux sentinelles et le **Comité** Paritaire pour le Suivi **Sanitaire** (**CPSS**) pour la surveillance des animaux au **niveau** des

points de vente. Cette collaboration a permis d'établir un important programme de collecte de prélèvements (sang et organes) d'animaux des troupeaux sentinelles et des divers marchés à bétail de la Ville de Nouakchott.

En ce qui concerne le suivi des marchés, il est prévu un rythme mensuel de prélèvements de 40 sérums d'animaux de diverses espèces (ovins, caprins, bovins et camelins) à partir des différents marchés à bétail. Les prélèvements ont débuté en Mars 99 et ont permis de stocker actuellement 300 sérums environ au CNERV:

Et, au niveau des troupeaux sentinelles, il est prévu de récolter environ 2500 à 3000 sérums et autres prélèvements par an

Le laboratoire dispose ainsi d'un système est capable, s'il fonctionne régulièrement, de lui fournir les prélèvements en nombre suffisant (avec 3500-4000 analyses possibles par an) pour une bonne évaluation et une surveillance de l'activité du virus de la FVR dans les principales zones d'élevage de la Mauritanie.

2.5. Le CNERV doit être en mesure de recevoir, d'analyser et de conserver les divers prélèvements (sérums, organes) d'animaux suspects de FVR. Une attention particulière doit être attirée sur le fait que les tissus des animaux malades sont hautement infectieux et qu'il y a un risque élevé de contamination. Des précautions toutes particulières doivent être prises lors de l'autopsie, des prélèvements et pour l'expédition.

Les paquets contenant les prélèvements doivent être préparés selon les normes internationales afin d'éviter tout risque de diffusion du virus.

Pour le traitement des prélèvements, le CNERV dispose d'une salle d'autopsie bien conçue mais dont la sécurité doit être améliorée en ajoutant deux (2) lampes à lumière ultra violette stérilisante et une lampe attrape-insectes. Cette amélioration vise à stériliser l'atmosphère de la salle d'autopsie et de détruire les moustiques vecteurs du virus présents dans l'environnement immédiat. De plus, l'équipement de cette salle doit être complété par un incinérateur pour détruire les cadavres par la chaleur en toute sécurité. Le CNERV est situé en zone d'habitations et la destruction des cadavres par enfouissement ne doit pas être de mise avec des prélèvements suspects de FVR.

2.6. Le CNERV doit être en mesure de mettre en œuvre les techniques de diagnostic de la FVR qui sont : le diagnostic virologique par l'isolement du virus à partir du sang ou d'organes d'animaux ou d'avortons sur animaux de laboratoire et sur cultures de cellules, le diagnostic sérologique par le test Elisa, la séro-neutralisation, l'immunofluorescence et le diagnostic histopathologique.

2.6.1. Le diagnostic virologique : est la technique idéale de diagnostic de la FVR et consiste à isoler et à identifier le virus sur des animaux de laboratoire (souris, hamster) ou sur cultures de cellules.

Mais cette technique présente des risques liés à la manipulation de matériels hautement infectieux et exige que les conditions suivantes soient remplies :

- un personnel technique vacciné contre la fièvre de la vallée (3 injections) et un rappel tous les ans.
- un laboratoire équipé de hotte niveau P2-P4 permettant de manipuler en toute sécurité,
- un usage de désinfectant à base d'hypochlorite auquel le virus est très sensible (eau javéalisée à 5%)

et une attention particulière pour les personnes impliquées dans les opérations d'autopsie de cadavres d'animaux suspects de FVR : travailler dans des conditions réduisant au maximum les risques de contamination (utiliser des gants, des masques).

La technique d'isolement du virus de la FVR, la plus sensible, est celle qui utilise l'inoculation d'animaux comme les souris nouveaux nés, le hamster et l'agneau. L'inoculum est constitué d'une suspension à 20% de tissu hépatique ou cérébral dans du PBS additionné d'antibiotiques. La présence de virus se manifeste par la mort des souris nouveaux nés 3-5 jours après l'inoculation par voie intracérébrale. Les fragments des animaux morts ou ayant présenté des signes de maladie sont alors testés avec des sérums spécifiques connus.

La seconde technique d'isolement du virus utilise l'inoculation de cellules sensibles comme les cellules Véro et BHK. La présence de virus se manifeste en 3-5 jours par un effet cytopathogène caractéristique. La caractérisation peut se faire par immunofluorescence directe.

Le CNERV dispose d'un personnel vacciné contre la FVR et est compétent pour traiter des produits infectieux comme ceux suspects de rage mais cependant l'état de l'animalerie ne permet pas de garder les souris inoculées en toute sécurité. L'étanchéité des salles réservées aux cultures de cellules et d'isolement de virus est à parfaire (réfection des fenêtres et climatisation par split). La mise en œuvre des cultures de cellules exige en plus l'acquisition d'un incubateur à CO2 car ceux existants sont vétustes et défectueux pour la régulation de la température.

Cette situation nous pousse à déconseiller le recours à cette technique d'isolement pour le diagnostic de la FVR au CNERV et de recourir à la collaboration avec les laboratoires de Dakar. L'inoculation du virus de la FVR à des systèmes sensibles entraîne une production massive de virus et augmente le risque de contamination pour le personnel et de diffusion du virus dans l'environnement.

2.6.2. Le diagnostic **sérologique** de la FVR utilise les tests suivants :

a) La technique **elisa** : est la technique **sérologique particulièrement recommandée** en raison de sa spécificité et de sa sensibilité. De plus, elle permet de traiter un grand nombre de **sérums** (200-300) en un laps de temps relativement court (24heures) et est capable de détecter **différentes** classes **d'immunoglobulines (IgG et IgM)**. Cette technique permet avec un **seul sérum** d'identifier une infection **virale** récente par la **présence de IgM**. Le CNERV dispose de la chaîne **complète elisa** (lecteur, ordinateur logiciel EDI-2.3 **elisa** data interchange et imprimante) et de la **compétence** nécessaire pour **réaliser** le test **elisa**. Nous rappelons qu'en 1998, 3833 sérums de bovins ont **été analysés** au CNERV par cette technique pour établir la situation immunitaire vis à vis de la peste bovine en **Mauritanie**. L'acquisition d'un distillateur d'eau permettra d'améliorer la **quantité** et la qualité d'eau **nécessaire** à la mise en place de ce test
La mise en place **définitive** de ce test **Elisa** au CNERV est suspendue à l'acquisition de réactifs. Certains sont disponibles sur le marché comme les conjugués, tampons et autres produits chimiques. Alors que des réactifs comme les **antigènes** viraux ou les **immuno-ascites** sont, au contraire, encore détenus par divers laboratoires de recherche **français** (Institut Pasteur), **africain** (Laboratoire **d'Onderstepoort**) et **américain** (CDC d'Atlanta). Ce qui aboutit à une diversité de tests et qu'il n'y ait pas de kit disponibles actuellement dans le commerce pour le diagnostic de la FVR par la technique **elisa**.
Des collaborations comme celle avec l'Institut Pasteur de Dakar doivent nous permettre de disposer des réactifs nécessaires (**antigène** et **immuno-ascite**) à la mise en place de ce test **Elisa** en Octobre 1999 au **CNERV**. A cet effet, le Chef de service de virologie, le Dr Kane sera en stage du **27/08** au **06/10/1999** sur les techniques **sérologiques** de la FVR à Dakar (Institut Pasteur et LNERV) et ramènera les réactifs nécessaires pour le démarrage du diagnostic **sérologique** de la FVR par **elisa** au CNERV en octobre 1999.
Par ailleurs, l'**A.I.E.** est entrain de tester un kit **elisa** FVR du Laboratoire **d'Onderstepoort** d'Afrique du Sud avec les laboratoires nationaux du **Mali** et du **Sénégal** pour le distribuer ensuite. La collaboration avec l'agence, déjà existante pour le diagnostic de la peste bovine au CNFRV, sera **sollicitée** dès que les **résultats** des tests en cours seront connus.

b) La technique de séro-neutralisation: C'est la technique de référence pour la FVR car c'est la plus spécifique et utilisable dès le **3^o** jour de l'infection. Les anticorps détectés par ce **test** persistent 6 mois à 1 an (et même plusieurs **années**) à des titres **élevés**. Toutefois, cette technique nécessite l'utilisation de virus vivant et de **cellules en culture**.
Elle permet d'analyser les sérums quelque soit l'**espèce** animale (ovine, caprine, bovine et cameline) avec les mêmes **réactifs** et dans un laps de temps compris entre 4-5 jours.
Elle est d'un coût plus faible que la technique **Elisa** car les réactifs (antigènes, virus, anticorps), **une** fois acquis, peuvent être produits par tout laboratoire ayant la capacité d'entretenir des **cultures** de cellules.
Le **CNERV** dispose, à l'exception d'un incubateur à CO₂, de tout le **matériel** nécessaire pour réaliser le test de **séro-neutralisation**. Les 2 incubateurs actuels sont vétustes et leur fonctionnement est aléatoire (**difficulté** d'avoir une température stable). Certains réactifs notamment la souche virale **Smithburn** (souche utilisée également comme vaccin pour les animaux contre la FVR) et le **sérum** de référence positif sont disponibles au CNERV et la technique **sera** mise en route dès l'acquisition de l'étuve à CO₂ et des milieux de culture pour cellules au plus tard en Décembre 1999.

c) La technique **d'immunofluorescence** est **une** technique d'application facile et déjà utilisée au CNERV pour le diagnostic de la rage. **Très** spécifique, l'immunofluorescence sur un étalement de foie, de **rate** ou de cerveau d'animal sacrifié en hyperthermie permet d'avoir un diagnostic rapide de FVR. Ainsi, il peut **être** utilisé pour identifier la présence de virus dans les **prélèvements** d'organes d'animaux suspects mais aussi pour détecter les anticorps anti virus de la FVR dans les sérums d'animaux.
Le CNERV dispose de l'équipement nécessaire mais a besoin de consommables le laboratoire : petit matériel (lames, lamelles), de **réactifs** (conjugués marqués à la fluorescence).
Les réactifs (conjugués fluorescents **anti-anticorps** de mouton, sérum de référence de mouton anti virus de la FVR) que nous avons apportés du LNERV de Dakar-Hann nous ont permis de l'appliquer au CNERV **sur** des cellules **Véro** infectées par la souche Smithburn.

2.6.3. La technique histo-pathologique est une technique pratique, rapide et très **spécifique** (donc fiable) de diagnostic de la FVR. Elle s'applique sur des fragments de foie placés dans de l'eau physiologique formolé à 10% et consiste à rechercher dans les cellules hépatiques des inclusions nucléaires, acidophiles, caractéristiques de la FVR.

L'équipement pour cette technique existe au service de cytologie de l'**Hôpital** de Nouakchott (**Dr Nasseridine**) et Dr Kane, titulaire d'un Diplôme de **3^e** cycle en Anatomie pathologie, Ecoles **Vétérinaires** Françaises a les

compétences pour **réaliser** ces analyses. Le CNERV serait alors le seul laboratoire de la sous région à appliquer cette technique et servirait de centre **vétérinaire** de référence pour le diagnostic histologique de la **FVR**. La mise en œuvre de l'examen histologique nécessite l'acquisition de consommables de laboratoire (réactifs et petit **matériel**) car la collaboration avec l'hôpital de Nouakchott pour l'utilisation du matériel est déjà acquise.

2.7. La liste de **matériel** propose (annexe 3) comporte des appareils permettant de disposer de l'eau de bonne **qualité** et en **quantité suffisante** pour mettre en œuvre des techniques exigeantes comme l'elisa, les cultures de cellules, la **séronéutralisation**, la préparation de tampons et de milieux pour faire face à l'augmentation du nombre-d'analyses pour la FVR et les autres maladies abortives.

Les réactifs pour les **différents** tests de diagnostic de FVR et des maladies **abortives** ont été précisés mais pour les **réactifs** pour le test **Elisa IgG/IgM** demandent des informations supplémentaires (**références** du produit) auprès de l'Institut Pasteur de Dakar qui pourrait fournir en **antigène** viral et en **immuno-ascite spécifique FVR**. Pour tout matériel et les divers réactifs, les caractéristiques techniques et les prix moyens et des coordonnées de 5 fabricants ou fournisseurs ont été précisés.

2.8. La formation en techniques de diagnostic de la FVR lors de la mission a concerné (Annexe 4):

a) la technique de culture de cellules Véro et de rein de **fœtus** de mouton a été appliquée: quatre (4) passages de cellules **Véro** de la banque de LNERV ont été réalisés, trois (3) embryons de **fœtus** de mouton obtenus des abattoirs de Nouakchott ont été traités et mis en culture lors de notre mission au CNERV.

b) La technique d'inoculation de la souche virale Smithburn sur les cellules **Véro** a été également exécutée et les récoltes de surnageant de cellules infectées ont permis de constituer une banque d'antigènes FVR au CNERV.

c) La technique d'inoculation de la souche virale Smithburn aux souriceaux nouveaux nés (par la voie **intra-cérébrale**) et aux souris adultes (par la voie **intra-péritonéale**) a été présentée.

d) La technique **d'immunofluorescence** indirecte sur cellules **Véro** infectées a été réalisée.

e) Les techniques **sérologiques elisa** et **séronéutralisation** ont été discutées et le nécessaire (le **matériel** et les réactifs) pour leur mise en œuvre au CNERV a été **précisé** (Annexe 3). Au moment où s'est **déroulée** la mission, deux (2) **des** trois (3) techniciens du laboratoire étaient en formation sur les techniques de diagnostic virologique au Laboratoire Central Vétérinaire de Bamako, au Mali.

Par ailleurs, le fonctionnement des appareils comme les hottes, les étuves a été présenté. Une réorganisation des **différentes** salles du laboratoire de virologie a été préconisée pour une meilleure **sécurité** et **efficacité** des manipulations. Des **aménagement**s des locaux (laboratoire, animalerie et salle d'autopsie) ont été présentés et leur coût évalué.

3. Conclusions et Recommandations:

La mise en place du diagnostic de la FVR au CNERV de Nouakchott est relativement aisée car le personnel technique et scientifique du laboratoire de virologie est qualifié pour les techniques de base de virologie (culture de cellules, techniques d'inoculation de cellules par des **prélèvements** suspects de variole de dromadaire, technique d'immunofluorescence pour le diagnostic de la rage, élevage d'animaux de laboratoire :**souris** Swiss). De plus, ce personnel est **vacciné** contre la FVR (3 injections effectuées après le foyer de 1998).

L'équipement actuellement **disponible** au laboratoire de virologie du CNERV, à l'exception des étuves, est conforme aux normes internationales, notamment la chaîne **elisa**, les hottes à flux laminaire et les microscopes inverse et à fluorescence (Annexe 6).

Le **démarrage** effectif du diagnostic de la FVR au CNERV est actuellement lié surtout à la **disponibilité** de réactifs et réactifs chimiques spécifiques au virus mais au renouvellement de quelques appareils vétustes (étuve à CO2) ou de faible capacité (distillateur d'eau) et aux quelques aménagements de locaux nécessaires pour **améliorer** la sécurité du personnel et de l'environnement.

3.1. Concernant les aménagements des locaux du laboratoire de virologie :

Ces aménagements visent à améliorer la **sécurité** lors de manipulation de prélèvements hautement infectieux et concernent la salle **d'autopsie** (pose de lampe à lumière ultra violette et lampe anti moustiques, pose de moustiquaires aux fenêtres), le laboratoire de virologie (**étanchéité** des fenêtres de la salle destinée, pose de lampes W, climatisation par Split, installation d'un perron pour épousseter l'**entrée** du laboratoire).

3.2. Concernant les réactifs et les produits spécifiques de la FVR :

Ces **réactifs** doivent permettre la réalisation du diagnostic virologique (test d'immunofluorescence) et **sérologique** (test d'**Elisa**, de Séroneutralisation et d'**Immunofluorescence**) de la FVR.

Le test **Elisa**, déjà couramment utilisée pour le diagnostic de la peste Bovine, nécessite des **réactifs** comme antigènes, **sérums anti-FVR**, conjugués, tampons, substrat, chromogène, etc.. pour sa mise en place au CNERV qui dispose déjà d'une chaîne **elisa complète** et fonctionnelle. Tous les **réactifs** ne sont pas encore disponibles dans le commerce, notamment les **antigènes** et les **sérums anti-FVR**, et doivent être acquis auprès de laboratoires de recherches. Les produits disponibles dans le commerce ont été établis (Annexe 3) et la collaboration avec l'Institut Pasteur de Dakar permettra de disposer des antigènes viraux et des hybridomes (**sérum** anti FVR) pour la mise en route de ce test.

Le test de **séroneutralisation** nécessite, en plus de milieux de culture et divers produits chimiques, l'emploi d'une souche virale et de cellules en culture. La souche virale Smithburn et les cellules Véro ont été mises à la disposition du CNERV. Les milieux de culture, le petit matériel et les produits disponibles dans le **commerce** ont été **précisés** (Voir annexe). Cette technique sera appliquée lorsque l'incubateur à CO2 sera disponible au CNERV.

Le test immunofluorescence, déjà couramment utilisée pour le diagnostic de la rage, a été réalisé pour le diagnostic de FVR sur cellules **Véro infectées** lors de notre mission grâce aux réactifs (conjugué fluorescent, **sérum** anti FVR) et matériels (lames pour immunofluorescence, microplaques) que nous avons apportés du LNERV de **Dakar-Hann**.

3.3. Les techniques recommandées pour le diagnostic de la FVR au CNERV sont:

- a) Le diagnostic virologique par mise en évidence d'**antigènes** viraux sur des étalements d'organes d'animaux suspects de FVR par la technique d'immunofluorescence directe ou indirecte. Cette technique est en place au CNERV et l'achat 'de conjugués **spécifiques** permettra de prendre en charge les prélèvements provenant de la **présente** campagne de surveillance de la FVR en Mauritanie.
- b) Le diagnostic sérologique par **elisa** par mise évidence d'anticorps anti FVR **IgG** et **IgM** dans les **sérums** d'animaux des troupeaux sentinelles et des divers marchés **à bétail** de Nouakchott est particulièrement recommandé. Il sera en place en Octobre 1999 avec la fourniture des réactifs provenant du commerce et de l'Institut Pasteur de Dakar.
- c) Le diagnostic **sérologique** par mise en évidence d'anticorps **neutralisants** dans les sérums d'animaux est une technique de référence **particulièrement recommandée** pour sa spécificité et son coût faible. L'acquisition d'une étuve à CO2 permettra de mettre en place la technique en Décembre 99 au CNERV qui dispose déjà de la technique de culture de cellules et de la souche virale Smithburn.
- d) Le diagnostic sérologique par immunofluorescence indirecte pour mettre en évidence les anticorps anti FVR dans les **sérums** d'animaux est recommandée parce qu'elle est **très** pratique, rapide, spécifique. Mise en place en Juillet 99, la prise en charge des prélèvements de la présente campagne dépend de la disponibilité en conjugué **anti-espèces** (mouton, chèvre, bovin et camelin).
- e) Le diagnostic histologique par mise en évidence dans les cellules hépatiques des inclusions nucléaires, acidophiles, caractéristiques de la FVR. Cette technique permettra de traiter les organes (foie surtout) d'animaux **malades** à la place **de la** technique d'isolement de virus. Ainsi, tout **prélèvement** d'organes pourra être analysé soit par l'anatomo-pathologique, soit par l'immunofluorescence, deux techniques très spécifiques et moins risquées, utilisables à la place de la technique d'isolement du virus pour le diagnostic de la FVR au CNERV.

En **définitive**, ces techniques permettent d'analyser tout prélèvement (**sérums**, organes) suspect de FVR et de poser un diagnostic rapide **et fiable** de la FVR au CNERV de Nouakchott. **Mais**, pour sauvegarder cet acquis, il est indispensable de doter le laboratoire de virologie d'**un** budget de fonctionnement pour faire face à l'achat de **réactifs** et de petit matériel **de laboratoire**. C'est une étape importante pour la surveillance de l'activité du virus et le contrôle de la maladie en Mauritanie, pays le plus exposé à la FVR de la sous région. Toutefois, la **menace** de la FVR est permanente pour les pays voisins en raison des échanges **transfrontaliers** et des mouvements traditionnels et commerciaux d'animaux.

Au niveau de la sous région, le contrôle de la FVR passe par la mise en place d'un **système** d'alerte précoce fonctionnel basé sur la surveillance des troupeaux sentinelles, l'existence de laboratoires nationaux de diagnostic vétérinaire fonctionnels et le suivi des modifications environnementales par l'imagerie satellitaire pour détecter, en temps réel, les **conditions prédisposant** à l'émergence de la FVR et ou poser le diagnostic de la FVR le plus rapidement possible. De telles informations sont **nécessaires** pour qu'une décision de vacciner puisse être prise, pour immuniser ainsi le cheptel et mettre l'homme hors de danger par contact avec les animaux infectés.

Annexe I:

Termes de référence pour le consultant international (TCDC) pour le diagnostic de laboratoire de la fièvre de la vallée du Rift.

Sous la supervision technique du chef de service **Santé animale** de la FAO et en collaboration avec le **coordonateur** national du projet, le **consultant** devra effectuer les tâches suivantes:

- Evaluer les capacités de diagnostic du **CNERV**, notamment pour le diagnostic de la fièvre de la **vallée** du **Rift**,
- Etablir avec le personnel du CNERV et le coordonnateur du projet la liste du matériel nécessaire à la mise en place d'une **unité** de diagnostic de la **fièvre** de la **vallée** du **Rift**,
- Faciliter la **délivrance** des **réactifs** et du **matériel nécessaire** à la mise en place de ces techniques,
- Effectuer la formation du personnel de laboratoire dans les **différentes** techniques de diagnostic,
- Evaluer toute autre tâche, si nécessaire ;

Préparer un rapport de consultation concis suivant les normes de la FAO en format Word 7.0 (sur disquette ou envoyé sous forme de pièce jointe par courrier électronique).

Annexe II
Emploi du temps de la mission.

13/07/1999:

- Arrivée à Rome à 8H (vol AZ639)
- Visite du service de santé animale au Siège de la FAO

14/07/1999:

- Arrivée à Nouakchott à 16H (vol AF 0764)

15/07/1999:

- Visite à la Représentation de la FAO en Mauritanie, rencontre de Mr Mourédine Kadra, Représentant en présence de Dr Lemrabott, **coordonateur** national du TCP/MAU/8923(E),
- Visite à la Direction des Ressources Agro-Pastorales (DRAP), Dr Fall, Directeur adjoint de la DRAP et **intérimaire** du Directeur national de la DRAP en mission hors de la Mauritanie.
- Visite au Centre National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires (CNERV) de Nouakchott et rencontre de Dr Idrissa Diarra, Chef du Service d'Épidémiologie et intérimaire du Directeur du CNERV en mission hors de la Mauritanie, Dr F.Schneegans, **Vétérinaire Coopérant** français et Conseiller en **épidémiologie** du service d'Épidémiologie du CNERV, Dr P.Nabeth, **Médecin Coopérant français** et **épidémiologiste** au Centre National de l'Hygiène (C.N.H) de Nouakchott
- Visite du laboratoire de virologie du CNERV et Rencontre de E Isselmou, technicienne à la place du chef de service en mission de prélèvements à Rosso, **région de Trarza** (région sud et frontalière avec le **Sénégal**).

Semaine du 17 au 22 /07/1999

17/07/1999:

- Visite à la DRAP et rencontre de Dr Doumbouya Baba au service de l'amélioration des ressources animales et de Dr Eric Clua, **Vétérinaire coopérant français** et conseiller technique du Directeur de la DRAP, Mr Abdoul Aziz Camara, **Ingénieur des Travaux d'Élevage (I.T.E)**, Chef de la division Coopératives et Mr Sidy Bouna Ould Gaouad, Responsable de la communication du Projet Parc, Dr P. Formenty, Consultant FAO en mission en **Mauritanie**.
- Visite au CNERV et Rencontre de Dr Kane, Chef de service de Pathologies infectieuses, suivies de préparation de matériels (lavage, **stérilisation**) pour la mise en place de la technique de culture de cellules au CNERV.

18/07/1999:

- Réunion au CNERV sur le protocole d'essai vaccinal avec les Drs Formenty (consultant FAO), Lemrabott (chef de service Santé animale), Diarra (Chef de service Epidémiologie), Schneegans (Conseiller en Epidémiologie), Kane (Chef de service de Pathologies Infectieuses) et E.Rua (conseiller technique à la DRAP).
- Visite à Rosso (ville frontalière avec le Sénégal) pour récupérer des réactifs en provenance du LNERV de **Dakar-Hann** (cellules Véro, souche **smithburn**, milieux de cultures, tampons, antibiotiques et de petits matériels pour cultures de cellules) et rencontre de Dr Saleck Ould mahoumoud, Chef de service de la DRAP de Rosso.

19/07/1999

- Trypsination (ou Passage) Mise en place de culture de cellules Véro (Trypsination ou passage des cellules) au Laboratoire de virologie du CNERV
- Elaboration de la liste des **réactifs** et des matériels nécessaires pour une unité de diagnostic de la FVR au CNERV.

20/07/1999

- Visite aux abattoirs de **Nouakchott** pour récolte de **foetus** de mouton.
- Mise en place de cultures de cellules de reins de mouton (digestion enzymatique des **fragments** de reins et mise en culture).
- Suivi des cellules Véro (renouvellement de milieu).
- Présentation de la liste du matériel et des réactifs en réunion avec les Drs Lemrabott, Formenty, Kane et Diarra,
- Finalisation de la liste et Envoi à Rome.

21/07/1999

- Suivi de l'évolution des cellules en culture (cellules véro, rein de mouton).
- Observation des cultures de cellules de reins de mouton.
- Présentation de la technique de culture de cellules primaires et de lignée.
- Discussion sur l'organisation des locaux du laboratoire de virologie aux fins de **diagnostic de la FVR**.

22/07/1999

- Suivi et manipulation des cultures de reins de mouton (renouvellement du milieu) et des **cellules Véro** (trypsination).
- Visite de l'animalerie (élevage de souris) et préparation de souriceaux nouveaux nés
- Visite d'élevages **pérjurbains** (autour de Nouakchott) de Dromadaires laitiers atteints d'**affection cutanée**.

Semaine du 24 au 29 /7/1999 (production d'antigènes FVR)

24/07/1999

- préparation de fœtus de mouton pour culture de cellules de rein.
- **Utilisation des cellules Véro (Technique d'Inoculation** de cellules Véro avec la souche virale FVR **smithburn**.
- Appui à la **Rédaction** de la communication **affichée** de Dr Kane sur la pathologie du **chamelon** en Mauritanie.

25/07/1999

- **Utilisation des cellules Véro** (Technique de Titrage de la souche virale FVR **smithburn**).
- Discussion sur les aménagements à **réaliser au laboratoire** de Virologie pour assurer une meilleure étanchéité.
- Suivi des cellules de reins de mouton (renouvellement de milieu de culture).

26/07/1999

- Utilisation des cellules **Véro (Récolte** du surnageant de cellules **Véro** infectées par la souche Smithburn).
- **Finalisation** de la rédaction de la communication affichée.

27/07/1999

- **Préparation** de fœtus de mouton **pour** culture de rein de mouton
- **Rencontre** de Mr **Diakité Abdoul salam**, Assistant **d'Élevage**, chef de la clinique **vétérinaire** de la DRAP (Délégation de Nouakchott), clinique **située** dans l'enceinte du CNERV.
- Participation à la DRAP à la **réunion** de restitution de Dr **Formenty** (consultant FAO) avec Drs **Lemrabotti**(coordonnateur national du TCP), Dr Fall (Directeur adjoint de la DRAP), Dr **Kane**(Chef de service de virologie du CNERV) et Mr Ahmeda **Ould mohamed Ahmed**, Charge de programme à la Représentation de la FAO en Mauritanie.

28/07/1999

- Utilisation des cellules **Véro(récolte** de surnageant de cellules infectées).
- Utilisation des **souriceaux** nouveaux **nés** (Technique d'inoculation par la voie **intracérébrale** de la souche smithburn).

29/07/1999

- Utilisation des cellules **Véro** (Présentation de la technique **d'immunofluorescence** sur **microplaques à 96 cupules** et sur lames **pour immunofluorescence** à partir de cellules infectées par la souche **Smithburn**)
- **Préparation** de culture cellules de reins à partir d'embryon de mouton
- **Présentation** des aménagements à effectuer à l'animalerie du **CNERV**(pose de moustiquaires, **réparation** de toiture).

Semaine du 31/07 au 05/07/1999 (Techniques de diagnostic FVR suite)

31/07/1999

- **Préparation** de culture cellules de reins d'embryon de mouton
- Utilisation des cellules **Véro** (Présentation de la technique d'immunofluorescence sur cellules véro infectées (déposées sur lame porte objet pour **IF**).
- Rencontre de Dr **M.Kane**, Chef de la Division de la Recherche Vétérinaire et zootechnique, responsable du programme national de formation des auxiliaires d'élevage.

1/08/1999.

- Utilisation des cellules Véro (**Trypsination** et renouvellement de milieu).
- Réunion de restitution de la mission à la DRAP avec le **Drs D.Diagana** (Chef de la Division de l'**Amélioration** des ressources Animales), **Lemrabott** (Coordonnateur national du TCP), **Kane** (Chef de service de virologie) et de Mr Ahmeda (**Chargé** de **programme** à la FAO-Mauritanie).

2/08/99

- Départ pour Dakar et **Arrivée** à Dakar le 02/08 à 21H30mn (RK0113).

Annexe III:

Liste du matériel et des réactifs pour le diagnostic de la FVR et des maladies abortives au CNERV de Nouakchott.

1. Pour le test **Elisa** [FVR]:

1.1 Microplaques à 96 cupules pour test **Elisa** avec couvercle (Nunc, maxisorb ou Immulon)

Quantité: 200

Prix catalogue (FF) : 2500

1.2 Filtre 450 nm pour lecteur **Elisa** Immunoskan MS (BDSL)

Quantité : 2

Prix (FF): 6000

1.3 Sérums et réactifs pour 4 000 sérums environ

1.3.1 Tampon bicarbonate, pH:9,2 en capsules

Réf : sigma C-3041

1.3.2 Tween 20, liquide

1.3.3 Lait écrémé en poudre

1.3.4 Hydrogen peroxide en tablettes

1.3.5 Orthophenylenediamine (OPD) en tablettes

1.3.6 Tampon Phosphate citrate en tablettes

1.3.7 Tampon PBS en capsules

1.3.8 Acide sulfurique 4N

1.3.9 sérums ami :

Sérum anti **IgG** de mouton marqué à la peroxydase

Sérum anti **IgG** de chèvre marqué à la peroxydase

Sérum anti **IgG** de bovin marqué à la peroxydase

Sérum anti **IgG** de dromadaire marqué à la peroxydase

Sérum anti **IgM** de mouton

Sérum anti **IgM** de Chèvre

Sérum anti **IgM** de Bovin

Sérum anti **IgM** de Dromadaire

Sérum anti souris marqué à la peroxydase (Réf. Cappel55558)

1.4 Bidistillateur d'eau inox. production de 2 litres / heure

Caractéristiques :

Conductivité : 1.5 µs/cm

Fonctionnement automatique

2 vannes indépendantes en eau mono et bidistillée

Sécurité manque d'eau

Conforme à la pharmacopée européenne

Débit : 2 litres,

Consommation l/h:72

Consommation Kw/h : 3.5

Alimentation 220 Volts et 50 Hz

Dimensions : HLP cm : 57x 55x 28

Poids kg 18-24

Avec accessoires :

Cartouche phosphatée et cartouche déchlorite

Prix catalogue approximatif (FF) : 33 000

1.5 Laveur de plaque manuel

Quantité: 1

Caractéristiques:

Utilisable pour des plaques 96 puits pour ELISA, pour des modules 8 puits, des barrettes Nucléolink, des plaques 384 puits,

Utilisable pour des plaques à fond rond et plat, diamètre du tuyau à raccorder: 5 à 8 mm

Livre avec kit de pièces de rechange

Prix (FF) : 4 500

2. Pour le test de séroneutralisation et isolement de virus FVR:

2.1 Microplaques à 96 cupules à fond plat pour culture de cellules avec couvercle

Quantité: 200

Prix catalogue (FF) : 4000

2.2 Flacons de culture 25 cm²,

Quantité :300

Prix catalogue (FF) : 2100

2.3 Flacons de culture 75 cm²

Quantité : 100

Prix catalogue (FF) : 1400

2.4 Plaques à 6 puits, fond plat avec couvercle, surface 9,4 cm²

Quantité : 50

Prix catalogue (FF) : 850

2.5 Pipettes :

Pipettes en verre Pyrex graduées de 5 ml, non stériles

division 0,1 ml

Quantité : 240

Prix catalogue (FF) : 600

Pipettes en polystyrène graduées de 5 ml, stériles et cotonnées

division 0,1 ml

Quantité : 400

Prix catalogue (FF) : 1000

Pipettes en polystyrène graduées de 10 ml, stériles et cotonnées

division 0,1 ml

Quantité : 500

Prix catalogue (FF) : 1 3 0 0

Pipettes en verre graduées de 10 ml, non stériles

Quantité : 120

Prix catalogue (FF) : 600

2.6 réactifs pour culture de cellules :

2.6.1 Milieu MEM Glasgow en poudre avec glutamine sans bicarbonate (NaHCO₃):

Quantité : 50 litres (flacons de 5 litres)

Prix (FF): 800

2.6.2 Sérum de veau foetal :

Quantité : 5 litres (flacons de 100 ml)

Prix (FF): 3150

2.6.3 Antibiotiques :

Pénicilline/Streptomycine en solutions concentrées en flacons de 5 ml

Quantité : 100 flacons

Prix approximatif (FF): 4000

Antifongique(amphotéricine B)

Quantité : 100 flacons

Prix approximatif (FF):4500

2.6.4 Trypsine en poudre

2 Flacon de 100 g

Prix (FF) : 2400

2.6.5 EDTA (Ver&re) en poudre

Flacon de 100 g

Prix (FF) : 110

2.6.6 Produits pour Tampon PBS :

Chlorure de sodium (**Nacl**) :

Quantité : 5 kg

Prix (FF) : 302

Chlorure de calcium **anhydre (Cacl)** :

Quantité : 500g

Prix (FF) : 550

Chlorure de **magnésium** :

Quantité : 500g

Prix (FF) : 150

Chlorure de potassium :

Quantité : 1 Kg

Prix (FF) : 150

Phosphate disodique (**Na₂HPO₄**) :

Quantité : **2Kg**

Prix (FF) :600

Phosphate monopotassique (**KH₂PO₄**):.

Quantité: 500g

Prix (FF) : 150

2.7 Etuve à CO₂

Nombre : 1

Caractéristiques :

Chauffage direct des parois **offrant** en rapport optimal volume **utile/encombrement**,

Volume interne de 15 l litres,

Le **système** de chauffage permet en outre de recouvrer la température de consigne après ouverture de porte, 4

Mise en service automatique « Autostart »

Humidité relative élevée préservant les cultures de la déshydratation,

PH stable par contrôle précis du CO₂

Fonctions d'auto-diagnostic.

Message d'erreur en cas de porte mal fermé,

Filtre **HEPA** sur arrivée CO₂

Cuve intérieur avec acier inoxydable

Avec accessoires disponibles :

Ecran de façade à 3 portes

Connexion pour surveillance centralisée

Passage de cloison
Interface RS 232 avec logiciel de documentation
Autres accessoires :
Etagères **supplémentaires** inox.,
Manodétendeur CO2 avec olive 4x 6 mm
Dimensions **extérieures**: L x H x P = 615 x 855 x 677 mm
Dimensions **intérieures** : L x H x P = 470 x 607 x 530 mm
Volume = 15 l litres
3 Etagères
Piège Température : +6 à +50 °C
Plage CO2 : 0 à 20 %
Humidité relative > 95 %
Electricité : 220 Volts, 50-60 Hz
Prix catalogue (FF): 40 000

2.8 Système de filtration

2.8.1 Pompe péristaltique : modèle à vitesse variable

Applications : répartition **immédiate** de milieux de culture avec filtration en ligne

Caractéristiques

Diamètre interne tubes (mm): 1.6 ; 3.2 ; 4 ; 5

Electricité : 220 Volts 50 Hz

Prix catalogue (FF) = 6 000

2.8.2 Unité de filtration :

Applications : destinée à clarifier et à stériliser des milieux de culture et autres solutions **aqueuses** de 100 ml à 3 litres. Ces unités fonctionnent sous pression pour éviter la formation de la mousse.

Caractéristiques : membrane Express en PES à **débit** et rendement **élevés** et à faible adsorption protéique pour la filtration **stérilisante** des milieux de culture, avec cloche, **stérile**, porosité : 0.22 µm

Prix catalogue (FF) pour les 100 = 3 000

3. Pour le test d'immunofluorescence (pour 200 sérums) [F'VR]:

3.1 Sérum anti **IgG** de mouton marqué à la fluoresceine

Ref Sigma : F-5137

3.2 Sérum anti **IgG** de chèvre marqué à la fluoresceine

Ref Sigma : F-9012

3.3 **Sérum** anti **IgG** de bovin marqué à la fluoresceine

Ref Sigma : F-4387

4. Pour le test de **fixation** du complément (pour 1000 sérums environ) [Fièvre Q]

4.1 antigène

4.2 sérum de contrôle négatif

4.2 sérum de contrôle positif

4.3 tampon Veronal Calcium-Magnésium (4 x 1 litre) : 15 flacons

4.4 **complément lyophilisé** (2 x 3.5 ml) : 15 flacons

4.5 **sérum** hémolytique (2 x 2.5 ml) : 5 flacons

4.6 Solution Alsever : 15 flacons

4.7 100 microplaques

5. Pour le test de fixation du complément (pour 1000 sérums environ) [Chlamydirose]

5.1 **antigène** lyophilisé

5.2 sérum de contrôle négatif

5.3 sérum de contrôle positif

5.4 100 microplaques

6. Pour le test de fixation du complément : (pour 1000 sérums environ) [Brucellose à *Brucella ovis*]

Kit CNEVA (France)

7. pour le test **Elisa BVD (pour 1000 sérums)**

8. Fournisseurs possibles :

8.1 Bioblock scientific

Parc d'innovation
F-67403 Illkirch Cedex
France
E mail : <http://bioblock.com>

8.2 Poly Labo

10, rue de la Durance
B.P. 36
67023 Strasbourg Cedex ; Tel : + 33 03 88 65 80 20 ; Fax : +33 03 88 39 74 41 & +33 03 88 65 9167
E mail : <http://www.polylabo.com>

8.3 Sigma Chimie

Sigma aldrich Chimie s.a .r.l
L'isle D'abeau Chesnes
BP : 701
38297 Saint Quentin Fallavier
Cedex France
Tel : 05 21 14 08 (numéro vert) + 33 4 74 82 28 00
Fax : 05 03 10 52 (numéro vert) + 33 74 95 68 08
E mail : <http://www.sigma.sial.com>

8.4 Fisher Scientific S.A

ZAC Clé de St Pierre
12, avenue Gay Lussac ; BP 2
78996- Elancourt Cedex
France
Tel : +33 (0)1 30 13 24 00 ;
Fax : + 33 (0)1 30 13 24 24 ;
E mail : export@fr.fishersci.com

8.5 SYNBIOTICS EUROPE

299 Avenue Jean Jaurès
69007 LYON
Tel : 33 (0) 4 72 72 33 84
Fax : 33 (0) 4 72 72 34 30

8.6 BioMérieux s.a

69280 Marcy-l'Etoile (France)
Tel : 33 (0) 4 78 87 20 00
Fax : 33 (0) 4 78 87 20 94
<http://www.biomerieux.com>

Annexe IV:

Techniques de Diagnostic de la FVR au Centre National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires (C.N.E.R.V) de Nouakchott.

A. Les techniques de cultures de cellules:

1. Technique de culture de cellules primaires de rein de mouton

1.1. Matériel

Embryon de mouton de 30 cm (de 3-4 mois environ)

Milieus et réactifs

Milieu de culture : MEMG

Sérum de veau nouveau né (SVF)

Antibiotiques : Pénicilline, Streptomycine et AmphotéricineB

Solution de trypsine-HBSS

Solution de tampon de lavage (tampon CMFS)

Alcool à 95°

Alcool iodé

Boîte d'instruments stériles :

3 paire de ciseaux droits

3 pinces à dents de souris

2 pinces mousse

3 lames de bistouri

1 manche de bistouri

1 cuillère à café

3 pinces à forcipressure

1 couteau de cuisine

Des gants en latex

Gaze et coton stérile

Verrerie :

4 boîtes de pétri moyenne

1 Erlenmeyer de 100 , ou 250 ml avec barreau aimanté

1 Erlenmeyer de 250 ml sans barreau aimante

1 Eprouvette graduée de 200 ml

1 entonnoir avec de la gaze stérile

Pipettes stériles de 5, 10 ml

Flacons de culture de 25 cm², 75 cm²

Tubes de centrifugation de 50 ml

Cellule de Thoma

Equipements :

1 bec bensen

1 centrifugeuse réfrigérée

1 microscope inversé

1 Hotte à flux laminaire,

1 étuve à CO₂

1.2 Méthodes

Préparation de l'embryon :

Choisir un embryon de 2 à 3 mois (de 30 cm de long au moins) dans son utérus d'aspect normal sans lésions de congestion. L'utérus est transporté intact jusqu'au laboratoire où le fœtus est extrait avec des précautions essentielles d'aseptie : Opérer dans une salle sans courant d'air (ou mieux avec atmosphère désinfectée par un aérosol antiseptique), Placer l'utérus gravide dans un bac en plastique contenant un antiseptique (eau javalisée à 3%),

Extraction de l'embryon sous la hotte:

Ouvrir les enveloppes fœtales avec un couteau de boucherie, Sortir le fœtus de ses enveloppes (vérifier l'espèce animale par la longueur de la queue) et le suspendre par les jarrets au dessus du bac en plastique (manipuler avec des gants), faire saigner le fœtus par section de la gorge et laisser saigner pendant 15 à 20 minutes environ,

Extraction des reins:

Désinfecter la sphère abdominale avec de l'alcool iodé ou de l'alcool à 90°, Inciser la paroi abdominale suivant la ligne médiane et découper latéralement et Rabattre le volet du flanc droit pour dégager le rein droit, Saisir le rein avec une paire de pinces à dents de souris et soulever, Découper le tissu conjonctif environnant (et autres attaches) pour détacher le rein Placer le rein dans une boîte de pétri stérile et fermer rapidement la boîte,

Procéder de la même façon pour le rein gauche, Placer les deux boîtes de **pétri** contenant les reins sous la hotte à flux laminaire,

Dissection des reins sous la hotte à flux laminaire:

Anatomiquement, les reins du mouton et de la chèvre sont semblables et se présentent sous forme de grain de haricot et ont une surface lisse. Au contraire, les reins de bovins sont multilobulés.

Inciser la capsule à l'aide du bistouri,

Décapsuler les reins en utilisant les pinces et les ciseaux,

Déshabiller les reins en sectionnant l'ensemble de l'enveloppe capsulaire à la base du hile du rein

Transférer les reins dans une boîte **pétri** neuve,

Découper le cortex **rénal** en **fragments** à l'aide d'une paire de ciseaux et pinces,

Rejeter la masse **médullaire** dégarnie,

Amincir les fragments de cortex en morceaux d'environ 2 mm de dimension en s'aidant de ciseaux et de bistouris,

Transférer les menus **fragments** dans un erlemueyer de 250 ml à l'aide de la **cuillère** à café.

Lavage des fragments du cortex:

Mettre 100 ml de tampon CMFS dans l'erlemueyer contenant les fragments du cortex rénal,

Agiter à vitesse modérée pendant 10 mn à température ambiante,

Arrêter l'agitation, laisser décanter et **éliminer** le liquide surnageant,

Laver une **2^o** fois avec la solution de tampon CMFS pour éliminer toute trace de sang

Répéter le lavage **jusqu'à** ce que le liquide de lavage ou surnageant soit clair,

Trypsination des fragments du cortex:

Rejeter le liquide de lavage et le remplacer par 100 ml de solution de trypsine (THBSS)

Laisser agiter pendant 15 mn à la température ambiante ou à **37°C**: c'est la **prétrypsination**,

Éliminer cette première solution de trypsine et la remplacer par 200 ml de solution **fraîche** de trypsine,

Placer l'**Erlenmeyer** à **37°C** et laisser agiter pendant 1 heure,

Au bout d'une heure, les fragments du cortex sont digérés.

Filter le digestat sur un entonnoir recouvert de quatre couches de gaze stérile,

S'il reste des morceaux non **digérés**, on peut les faire digérer pendant 30 mn à **37°C** dans une solution fraîche de trypsine.

Ajouter 5% de **sérum** de veau au digestat pour arrêter l'action de la trypsine.

Mettre la suspension obtenue dans des tubes de centrifugation de 50 ml avec couvercle à vis,

Centrifuger pendant 5 mn à 2000 tours par mn à la **température** de **20 C°**

Éliminer le surnageant et Noter le volume du culot cellulaire avec une pipette de 5 ml

Mise en culture des cellules de reins de mouton:

Mettre le culot cellulaire en suspension dans du milieu de croissance (**MEMG à 10%SVF**) dans un rapport de **1** ml de culot pour 100 ml de milieu de culture,

Repartir la suspension cellulaire ainsi obtenue dans des flacons de culture, à raison de 5 ml de suspension cellulaire pour les flacons de 25 cm², de 15 ml de suspension cellulaire pour les flacons de 75 cm²,

Observer au microscope inverse l'aspect de la suspension cellulaire

Placer les flacons à **37°C** dans une étuve sèche ou à CO₂

Observer les cellules au bout de 24 heures pour **vérifier** la fixation des cellules ou fragments sur la **paroi du** flacon et aussi l'absence ou présence **de** contamination **indésirable** (bactérienne et fongique),

En cas d'absence de contamination, les flacons sont replacés à l'**étuve** et observer tous les **jours** pour suivre l'**évolution** du tapis cellulaire.

En cas de contamination bactérienne et fongique, tous les flacons sont éliminés et l'**étuve désinfectée**.

Evolution du tapis cellulaire:

Les flacons contenant des fragments et des cellules **fixés** sont incubés et le milieu **surnageant** (**MEMG à 10% de SVF**) est renouvelé au bout de **48 ou 72** heures selon que la croissance des **cellules** est **rapide ou non**.

Le tapis peut être confluent au bout de 24 heures **après** ce renouvellement du milieu de **culture**.

Annexes pour culture de cellules de rein de fœtus de mouton:

1. Composition du tampon de lavage des fragments de reins de mouton et de cellules (ou Calcium **Magnesium** Free Solution ou solution CMFS)

Chlorure de sodium : 80 g
Chlorure de potassium : 2g
Phosphate disodique: 29g
Phosphate monopotassique: 2g
Eau distillée : Q.S pour 10 litres
Ajouter de la pénicilline: 1000 000 UI et de la streptomycine : 1 g
Filtrer ou **autoclaver** pendant 40 mn entre 100 et 115°C
Répartir en flacons de 500 ml, pH : 7.4 et Conserver à 4°C+

2. Composition de la solution de **trypsine-versène**

Utilisée pour dissocier les cellules en monocouche sur des surfaces de verre ou de plastique des **différents** flacons de culture:

Glucose: 1000 mg
Chlorure de potassium: 400 mg
Chlorure de sodium: 8000 mg
Bicarbonate de sodium: 580 mg
Trypsine: 500 mg
Versène: 200 mg
Pénicilline: 200 000 UI
Streptomycine: 20 000
Rouge de phénol: 10 ml de 0.2% de solution
Eau distillée: 1000 ml
pH :7.4-7.6, **Stériliser** par filtration (filtre 0.2 um)
Aliquoter à raison de 10 ml par tube et conserver à -20°C.

3. Composition de la solution de trypsine pour dissocier les menus fragments de reins ou autres tissus comme les testicules (solution Trypsine **Hanks-BSS**):

Chlorure de sodium: 8g
Chlorure de potassium: 4g
Sulfate de Magnésium: 2g
Chlorure de calcium: 0.2g
Dextrose: 1g
Bicarbonate: 0.58g
Eau distillée: 1000 ml
Trypsine: 3g
Rouge de phénol: 10 ml de 0.2% de solution
Stériliser par **filtration** (filtre 0.22 um)
Répartir en flacons de 100 ml
Conserver à +4°C.

2. Technique de culture de cellules de lignée Véro:

2.1. Matériel

Flacon de culture de cellules Véro confluentes

Milieux et réactifs :

Milieu de culture : MEMG

Sérum de veau nouveau né (SVF)

Solution de **trypsine-Versène(TV)**

Alcool à 95°

Alcool iodé

Des gants en latex

Verrerie:

2 flacons de 100 ml

1 Eprouvette graduée 200 ml

Pipettes stériles de 5, 10 ml

Flacons de culture de 25 cm², 75 cm²

Cellule de Thoma ou de **malassez**

Equipements :

1 bec **bensen**

1 microscope inverse

1 Hotte à flux **laminaire**,

1 étuve à CO₂

2.2 Méthodes:

Examiner au microscope inverse l'état des cellules et ne retenir que les cellules qui **présentent** un tapis confluent de 3 à 4 jours,

Vérifier l'absence de contamination bactérienne, mycoplasmaïque et fongique par le même examen microscopique,

Placer la boîte dans une atmosphère stérile (dans la hotte à flux **laminaire**),

Réchauffer les milieux de cultures, sérum de veau, solution de trypsine à 37°C au bain marie,

Vider le milieu surnageant les cellules dans **un** récipient contenant un antiseptique (eau de javel ou détergent domestique),

Mettre 3 ml de solution de TV dans le flacon de culture (flacon de 75 cm²), l'étaler sur le tapis cellulaire pendant 1 mn à la **température** ambiante (sous la hotte) et vider le flacon : c'est la **pré-trypsination**,

Mettre de nouveau 3 ml de TV dans le flacon de **culture** et laisser étaler la TV sur le tapis **cellulaire** pendant 1 mn sous la hotte et retirer 1.5 ml (la moitié) de la TV. Le reste de TV constitue un mince filet de liquide sur les cellules et placer la boîte à 37°C dans l'étuve pendant 2 à 3 mn pour faire agir la trypsine,

Vérifier la dissociation des cellules au microscope au bout des 3 mn et tapoter sur le flacon pour le décollement des cellules de la paroi du flacon,

Reprendre les cellules dans un milieu MEMG enrichi de 10% de SV,

Faire une **numération** avec la cellule **de** Thoma ou de **Malassez** et ramener la concentration de cellules à 200 000 **ou** 300 000 cellules par ml,

Repartir la suspension de cellules ainsi obtenue dans des flacons de 75 cm², à raison de 20 ml par flacon,

Observer les suspensions cellulaires **au** microscope : les cellules se déposent par gravité, se fixent sur la paroi du flacon,

Placer les flacons 37°C à l'étuve : à cette température, les cellules se multiplient en une couche monocellulaire pour former un tapis **cellulaire** au bout de quelques jours.

Observer tous les jours au **microscope**,

Renouveler le milieu de culture, si nécessaire, lorsque le pH devient trop acide (couleur jaune),

Constater que le tapis cellulaire est complet avant de procéder aux actions ultérieures notamment le **passage** des trypsination ou le remplacement du milieu de croissance (MEMG à 10% de SV) par un milieu d'entretien (MEMG à 5% de SV),

Utiliser le milieu d'entretien : il consiste au renouvellement du milieu de culture surnageant **un** tapis cellulaire complet par un milieu à 5% de SV. Les flacons peuvent être placés dans une salle propre à la température ambiante et à l'obscurité et les cellules **seront ainsi conservés dans un état de vie au ralenti pendant des**

Annexes pour **culture** de cellules **Véro**:

composition des milieux utilisés pour déterminer la stérilité bactérienne, fongique et mycoplasmaïque.

1. Composition du Mycoplasma Broth base (recherche de mycoplasmes)

Beef heart infusion	6,0 g
Pancreatic digest of casein	5,0 g
Yeast autolysate	5,0 g
S o d i u m chloride	5,0 g
Eau distillée	1000 ml

2 Composition de Tryptose Soya Broth (recherche de bactéries aérobies)

Hydrolysate Trypsique de caséine	17,0 g
Peptone papainique de soja	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium	2,5 g
Glucose	2,5 g
Eau distillée	1000 ml

3. Composition du Bouillon **sabouraud** (recherche de champignons)

Peptone pancréatique de caséine (biotrypticase)	5,0 g
Peptone pepsique de viande (biotone)	5,0 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1000 ml

4. Composition du Bouillon Gourlay (recherche de mycoplasmes)

Bacto tryptose Difco	20 g
Glucose	5 g
NaCl	5 g
Phosphate disodique anhydre	2,5 g
Glycérol	5 g
Extrait de levure	1 g
Eau distillée	1000 ml
Pénicilline-Streptomycine	
Sérum de cheval	
Rouge de phénol	

5. composition de Thioglycolate **avec résazurine** (recherche de **bactéries** aérobies et anaérobies)

Bio tryptose	15 g
L cystine	0,5 g
Glucose	5 g
Extrait de levure	5 g
Chlorure de sodium	2,5 g
Eau distillée	1000 ml

3. Technique de cryo-conservation de cellules de lignée **Véro** :

Elle consiste à conserver des cellules par congélation à la température de -70°C ou à celle de l'azote liquide (-196°C) en présence d'un cryoprotecteur appelé Di méthyl Sulfoxide (DMSO).

3.1. Matériel :

Culture de **cellules Véro** de 24 à 48 heures
Solution de **trypsine-Versène**
Solution stérile de cryoprotecteur DMSO
Cryotube de 2 ml
Milieu MEMG
Sérum de veau
Azote liquide
Congélateur à -70°C
Bonbonne d'azote liquide
Alcool à 70°

3.2. Méthodes :

3.2.1. Méthode de **congélation** :

Trypsiner la boîte de cellules **véro**

Numérer les cellules

Centrifuger les cellules

Reprendre les cellules dans un mélange **extemporané** du cryoprotecteur : MEMG : 70%, SV :20% et DMSO : 10% (place à $+4^{\circ}\text{C}$) à raison de 10 millions de cellules par ml.

Pour chaque cryotube, mettre 1 ml de suspension cellulaire.

Placer le cryotubes pendant 24 à 48 heures à -70°C avant de les placer dans l'azote liquide et il conserve les **cellules** pendant des **années** (tant que l'azote liquide est présent dans la bonbonne à un niveau suffisant).

ou

Placer uniquement les cryotubes à -70°C et les cellules peuvent se conserver ainsi pendant des mois.

3.2.2. Méthode de **décongélation** :

Sortir le cryotube du congélateur ou de l'azote liquide,

Placer le tube pour le **décongeler** rapidement dans un **becher** de 100 ml contenant de l'alcool à 70° réchauffé au bain marie à 37°C ,

Reprendre le contenu du cryotube dans du milieu de croissance (**MEMG** à 10 % de **SV**) : Mettre le contenu du **tube dans 15 ml de milieu**,

Placer le flacon de culture à 37°C pendant 4 à 6 heures et renouveler le milieu de culture,

Replacer le flacon de culture à 37°C pendant 24 à 36 heure pour avoir un tapis complet.

Faire un passage ou **une** trypsination.

B. Technique d'isolement du virus de la FVR :

Le virus de la FVR, comme la plupart des arbovirus, peut être isolé à partir de sang, d'organes(foie, rate, rein et **cerveau**) de ruminants **infectés**. Ces **prélèvements** doivent être conservés sous froid jusqu'à leur utilisation au laboratoire. Pour leur isolement, on utilise des animaux de laboratoire (hamster et souris) et diverses cellules en culture comme les cellules **véro** ou les cellules primaires de ruminants.

1. **Précautions** préalables

Un **personnel** formé aux techniques de base de la virologie doit être responsable des isolements du virus de la FVR et il doit être vacciné avec le vaccin **tué**(subir 2 à 3 injections du vaccin),

Un laboratoire **équipé** de niveau P2 à P4 est recommandé

Une animalerie (souris et hamster) propre et pourvu de moustiquaire aux ouvertures (portes et fenêtres)

Un usage de **désinfectant** à base d'hypochlorite est nécessaire

Une attention particulière pour les personnes impliquées aux opérations d'autopsie de cadavres **d'animaux** suspects de FVR car le risque de **contamination** est grand : utiliser des gants, des masques et travailler dans des conditions réduisant le risque d'infection (sous une hotte P2 au moins).

2. **Préparation** des prélèvements:

Les types de prélèvements utilisables pour l'isolement du virus sont :

2.1. Le sang sous anticoagulant (ou sang **hépariné**)

Le sang est prélevé chez des animaux **hyperthermiques** dans des tubes fermes ou scellés, identifiés et transportés dans une glacière avec de la glace ($+4^{\circ}\text{C}$) jusqu'au laboratoire.

Le sang est centrifugé et le plasma est recueilli(avec une pipette) sous la hotte dans un tampon de **transport**. Le plasma est dilué au 1/5 dans ce tampon de transport et est réparti en aliquots de 1 à 2 ml dans des **cryotubes** qui sont conservés à +4°C ou à -70°C jusqu'à leur utilisation.

2.2. La rate, le foie ou organes **d'avortons(placenta, diverses membranes)**.

Prélever 1 à 2 grammes de tissus et les placer dans un tube et un **réceptif** de transport scellés et solide (pour **éviter** les risques de cassure). **Les prélèvements** sont transportés dans de la glace.

Au laboratoire, les **prélèvements** sont broyés (avec un mortier et un pilon ou un broyeur **électrique**) avec du sable stérile dans une solution de Hanks BSS additionné d'antibiotiques : pénicilline, streptomycine et **amphotéricine B** sous une hotte à **flux** laminaire. Le **prélèvement** est repris dans le tampon PBS suivant un rapport de 1 g de **tissus pour 9 ml** de tampon Hanks BSS.

Pendant le broyage, le **prélèvement** et le matériel doivent être dans de la glace **fondante**(température de 0°C environ). Le broyage doit **être** fait par des mouvements lents pour **éviter** un échauffement des tissus. Une élévation de température des tissus pendant le broyage entraîne une destruction du virus.

Cette opération présente un risque de contamination pour le manipulateur et nécessite toutes les précautions prévues au 5.1.

Le broyat est **centrifugé** à 400-600g à la **température** de +4°C. Le surnageant est récupéré et est distribué en aliquots de 1-2 ml dans des cryotubes et sont conservés à la **température** de +4°C ou à la température de - 70°C jusqu'à leur utilisation.

La composition du milieu de transport est le **Hanks BSS** (Hanks Basic Salt Solution) avec 0.5% d'hydrolysate de lactalbumine ou 0.75% de sérum albumine bovin à pH 7.4 avec 500 **ui/ml** de **pénicilline** et 500 **ug** de streptomycine et 100 **ui/ml** de **Amphotéricine B**.

2.3 Isolement du virus de la FVR sur animaux de laboratoire :

2.3.1. Sur hamster:

Le hamster est l'animal de choix pour le primo isolement du virus de la FVR à partir de **prélèvements** provenant d'animaux suspects de FVR.

Choisir deux animaux de 6-12 semaines par **prélèvement**,

Inoculer 0.1 ml par animal par la voie **intrapéritonéale** et les animaux peuvent succomber en moins de 48 heures

Observer les animaux pendant 5 jours mais les animaux peuvent succomber 48 heures après l'inoculation,

Récolter de façon **stérile** le foie qui apparaît hypertrophié et de petits foyers de nécrose,

Broyer 0.5 à 1 g de foie et diluer à 10⁻⁴ et 10⁻⁶ pour effectuer un second passage sur hamster ou sur souris

Conservé les **prélèvements** à -70°C ou dans de l'azote liquide

2.3.2.. Sur Souris:

Choisir 4-5 souris de 6 semaines ou plus âgées par **prélèvement**,

Inoculer 0.1 ml par animal par la voie intrapéritonéale et les animaux meurent entre 2 et 5 jours

Observer les animaux pendant 5 jours.

ou

Choisir des souriceaux nouveaux nés

Inoculer 0.02 ml par la voie **intra-cérébrale** et les animaux meurent entre 36 heures et 5 jours

Récolter le **cerveau** de façon stérile (sous la hotte)

Broyer le cerveau et diluer à 10⁻⁴ et 10⁻⁶ pour effectuer un second passage sur hamster ou sur souris

Conservé les **prélèvements** à -70°C ou dans de l'azote liquide

2.4. Isolement du virus de la FVR sur culture de cellules:

2.4.1. Types de **cellules**

Une grande variété de **cellules** sont sensibles au virus de la FVR.

Des cellules de **lignée** comme les cellules Véro, BHK2 1, MDBK sont utilisables .

Des cellules primaires de rein, de testicule, de poumon, **d'endothélium**, de muscle de mouton et de **bovin** sont sensibles au virus.

Des cellules provenant de moustiques sont utilisables aussi.

2.4.2. Technique d'inoculation des cellules:

Utiliser des cellules en culture **confluente** dans des tubes ou des flacons de 25 **cm2**(petits flacons)

Faire deux dilutions de l'**inoculum** : première dilution au 1/10^e et une deuxième dilution au 1/100^e,

Faire un contact entre cellules et inoculum de 1 heure à 37°C,

Laver les cellules 3 **fois-avec** du Hanks BSS avant de mettre du milieu de maintenance (**MEMG** à 5% de **SV**),

Incuber les cellules à 37°C et observer tous les jours pour voir l'apparition de l'effet **cytopathogène (ECP)** provoqué par le virus. Cet ECP apparaît au bout de 24 à 48 heures pour les cellules **très sensibles** comme les cellules **véro** et il peut être plus tardif (au **5^e jour**) sur les cellules primaires. Le virus est récolté dans le surnageant cellulaire après un cycle de congélation-décongélation du tube ou flacon de cellules **infectées**.

Un diagnostic rapide de la FVR peut être obtenu en utilisant des tubes avec lamelles car les cellules infectées pour **révéler l'antigène viral** au bout de 24 à 48 heures par la technique d'immunofluorescence.

3. Techniques d'identification du virus de la FVR :

Deux techniques sont présentées : la technique d'immunofluorescence et de séroneutralisation sur culture de cellules Véro.

3.1. La technique d'immunofluorescence:

C'est la technique la plus pratique et la plus rapide (au bout de 12 à 24 heures) pour révéler la présence du virus de la FVR dans des **prélèvements** suspects ou des cultures de cellules infectées.

Elle est appliquée sur les cellules **Véro** infectées d'une part et d'autre part, sur les cerveaux, foie, rate et les reins d'animaux infectés par le virus.

Les meilleurs **résultats** sont obtenus avec des cellules infectées : Ces cellules sont **cultivées** dans des tubes ou des cupules avec lamelles et sont ensuite inoculées avec le **prélèvement** suspect de FVR. Ces lamelles avec cellules infectées peuvent être **examinées** par immunofluorescence 12 à 24 heures après leur inoculation avec du **prélèvement** suspect.

Avant l'examen au microscope à fluorescence, les lamelles subissent le traitement suivant :

Les lamelles sont **lavées** 3 fois avec du tampon PBS et sont séchées. Elles sont fixées à l'acétone (à -20°C) pendant 10 mn, sont **séchées** et sont alors prêtes. Ces lamelles de cellules infectées ainsi **traitées** peuvent être conservées à + 4°C pendant des semaines à l'obscurité avant leur utilisation en immunofluorescence directe ou indirecte.

3.1.1. Technique d'immunofluorescence directe:

utilise des **sérums** anti virus de la FVR marqués à la fluoresceine.

De tels **sérums** peuvent être préparés à partir de **sérums** hyper **immuns** de lapin ou de cheval marqués avec la fluoresceine. Le **sérum** anti FVR fluorescent est utilisé à une dilution prédéterminée (dite dilution de travail) sur les lamelles de cellules **infectées** par le virus et déjà fixées à l'acétone. Ces lamelles sont réhydratées (les plonger dans de l'eau **distillée**) avant d'être mises en contact avec le **sérum** anti pendant 40 mn à 37°C.

Les lamelles sont lavées 3 fois dans du PBS (5 mn par lavage) et sont montées (face avec cellules infectées collée à la lame porte objet) dans du tampon PBS avec **glycérol**. Elles sont observées au microscope à fluorescence au grossissement X40.

Les lamelles de cellules **témoins** non **infectées** ne présentent pas de fluorescence alors que les lamelles avec cellules **infectées** présentent une fluorescence intracytoplasmique. Cette fluorescence est plus importante sur des cellules infectées de 48 ou 58 heures.

3.1.2. Technique d'immunofluorescence indirecte:

Cette technique utilise deux sérums : un sérum positif en anticorps anti-virus de la FVR d'un animal donné (mouton, chèvre, bovin, . . .), un **sérum** anti espèce marqué à la fluoresceine.

Les lamelles avec cellules **infectées** avec le virus suspect sont **réhydratées**.

Le **sérum** anti FVR d'espèce est dilué (au 1/20) et mis sur les lamelles de cellules **infectées** et lamelles de cellules témoin non infectées pendant 40 mn à 37°C (20 µl par spot).

Les lamelles sont lavées 3 fois dans du tampon PBS (5 mn par lavage).

Le **sérum** anti espèce marqué à la **fluoresceine** est dilué (dilution de travail précisé par le fabricant) et mis sur les lamelles pendant 30 mn.

Les lamelles sont lavées 3 fois dans du tampon PBS.

Les lamelles sont montées dans du tampon PBS glycérolé et observé au microscope à fluorescence.

Les lamelles avec cellules infectées présentent une fluorescence nette alors que les lamelles témoin **restent sans** fluorescence.

3.1.3. Quelques références pour conjugués fluorescents:

- Anti Goat **IgG** (whole molecule) FITC conjugate developed in **Rabbit**, Ref : F-90 12, **IgG** fraction of **anti** serum
- **Anti** Sheept **IgG** (whole molecule) FITC conjugate developed in **Rabbit**, Ref : F-5137, **IgG** fraction of **anti** serum
- **Anti** Bovine **IgG** (whole molecule) FITC conjugate developed in **Rabbit**, Ref : F-4387, **IgG** fraction of **anti** serum

Adresse du fournisseur • :

SIGMA Chemical Compagny, P.O.BOX 14508. ST LOUIS. MO., 63 178, U.S.A

Tel : 3 14 7715750 (for orders), 3 14 7715765 (for customer)

3.2. La technique de séro-neutralisation sur cellules Véro:

Cette **technique** sert à la fois à identifier le virus de la FVR qui sera ainsi neutralisé de façon spécifique par un **sérum hyperimmun connu** et à **révéler** le pouvoir neutralisant d'un **sérum (serodiagnostic)** provenant d'un animal infecté par le virus de la FVR.

3.2.1. Matériel:

Souche virale Smithburn titrant **10+6,5** DCPSO par ml
Cellule **Véro**: Flacon de 75 cm² de culture **confluente** de 48 heures
Micropipette à **1 canal** de 10 à 100 ul
Micropipette à **8 canaux** de 50 à 300 ul
Cônes stériles
Bacs de dilution **stériles**
Erlenmeyers **stériles** de 250 ml
Ballons de 100 ml
Eprouvettes graduées stériles de 200 ml
Pipettes stériles de 5 et 10 ml
Microplaques à **96** cupules pour culture de cellules
Milieu MEMG
Sérum de veau
Solution Trypsine **versène**
Solution d'antibiotiques : pénicilline, Streptomycine & **Amphotéricine B**
Hotte à flux **laminaires**
Étuve à CO₂
Microscope inverse
Bainmarie

3.2.2. Méthodes

3.2.2.1. Pour l'identification du virus : vise à démontrer la neutralisation d'un **isolat** de virus FVR par un **sérum hyperimmun anti-virus** de la FVR. Cette technique peut utiliser les souris de laboratoire ou des cellules en culture. Nous **présentons** la technique de **séronéutralisation** sur **cellules Véro** sur microplaques :

Prendre un isolat de virus dont on **connaît** le titre et déterminer la dilution d'utilisation qui donne 100 DCPSO par **50 ul**,

Prendre un **sérum** positif anticorps anti FVR et un **sérum** négatif en anticorps anti **FVR**,

Diluer le sérum positif au **1/20** dans les 4 cupules (A1-D1) et le **sérum** négatif dans les cupules (E1-F1),

Poursuivre les **dilutions** des deux **sérums** négatif et positif de **1/40** au **1/10240** (de la colonne 2 à la colonne 9),

Ajouter le virus dilué dans les cupules à raison de 50 ul (quantité de 100 DCPSO),

Incuber 1 heure à **37°C** sous agitation,

Ajouter des cellules à raison de 50 ul par cupule et réserver les colonnes **10 à 12** pour **témoins cellules et témoin virus**.

Incuber à 37 °C dans une étuve à CO₂.

Noter l'évolution du tapis et l'apparition **d'ECP** au bout de 2 à 3 jours.

La présentation de neutralisation spécifique du virus se traduit par une absence **d'ECP** à la dilution 1040 et même plus selon le titre du sérum positif en anticorps **anti FVR**. Cette neutralisation **indique que la souche testée** est identique au virus **de la FVR**.

3.2.2.2. Pour le serodiagnostic : recherche d'anticorps neutralisant le virus de la FVR dans les sérums d'animaux infectés naturellement ou vaccinés.

Décomplémenter les sérums à **56°C** pendant 30 mn.

Diluer les **sérums** au **1/20** dans une microplaque à 96 cupules : 10 ul de sérum dans 190 ul de milieu de culture

On peut diluer 96 **sérums** par microplaque.

Rediluer chaque sérum au **1/40°**, **1/80°** et **1/160°** dans une autre microplaque :

Distribuer 50 ul de milieu MEMG dans tous les cupules d'une microplaque

Mettre 50 ul du sérum dilué au **1/20°** dans le 1 cupule pour obtenir **1/40°**

Mettre 50 ul du sérum dilué au **1/40°** dans le 2 cupule pour obtenir **1/80°**

Mettre 50 ul du **sérum** dilué au **1/80°** dans le 3 cupule pour obtenir **1/160°**

On peut diluer ainsi 32 **sérums** d'animaux par microplaque.

Ménager des témoins **sérums** positif et **négatif**, des témoins cellules et des témoins virus pour chaque manipulation

Diluer la souche de sorte à avoir 100 DCPSO dans 50 ul de milieu : il faut diluer la souche titrant **10+6.5** au **1/1500°** pour obtenir la concentration utilisable (de 100 **DCP50/50** ul).

Ajouter 50 ul du virus dilué au **1/1500°** aux **sérums** dilués.

Incuber l'ensemble **sérums** + virus à 37°C pendant 1 heure.

Ajouter des cellules à raison de 100 ul par cupule d'une suspension de concentration égale à 200 000 **cel.** / ml

Incuber à 37°C à l'étuve à CO₂

Observer les cultures de cellules tous les jours.

Lire les microplaques au bout de 3 à 4 jours et Noter les cupules présentant un effet cytopathogène.

Résultats :

Un **sérum** est négatif dans les cas suivants :

- lorsque l'effet cytopathogène est présent aux dilutions 1/40°, 1/80°, 1/160° (aucune **activité** neutralisante)
- lorsque l'effet cytopathogène est **présent** à une des dilutions 1/40°, 1/80°, 1/160° .

Un **sérum** est positif lorsque l'effet cytopathogène du virus n'est observé à une des dilutions 1/40°, 1/80° et 1/160° .

Le témoin sérum positif de **référence** ne doit pas présenter d'effet cytopathogène (témoin de l'activité neutmlisante des anticorps sériques)

Le témoin cellules non **inoculées** doit être sans effet cytopathogène (témoin de la bonne **qualité** du milieu et des cellules utilisées).

Le témoin virus doit présenter un effet cytopathogène au niveau de toutes les cupules **inoculées** (témoin de la sensibilité des cellules à la souche vitale utilisée).

C. Technique de titrage du virus de la FVR:

Cette technique vise à mesurer la **quantité** du virus présent dans un surnageant de cellules ou de broyats d'organes d'animaux infectés.

1. Matériels:

Surnageant de cellules **infectées**,

Culture **confluente** de cellules **Véro**,

Milieu MEMG,

Sérum de veau,

Solutions d'antibiotiques,

Solution de trypsine **versène**,

Microplaque à 96 cupules,

Micropipette de 10-200 ul,

Tubes de 5 ml stériles

2. Méthodes:

- Diluer le surnageant viral de 10-1 à 10-8 dans les tubes de 5 ml :

Mettre 0.2 ml de surnageant viral dans 1.8 ml de milieu dans le 1^{er} tube pour obtenir une dilution au 1/10° (10-1),

Ensuite 0.2 ml de la dilution au 1/10° dans 1.8 ml de milieu dans le 2^{er} tube pour obtenir une dilution au 1/100° (10-2)

Continuer jusqu'à obtenir une dilution au 10-8 dans le 8^{er} tube

- Repartir chaque dilution dans 10 cupules d'une rangée de cupule, à raison de 100 ul par cupule :

Exemples :

la dilution 10-1 dans les 10 cupules (A2-A11), 10-2(B2-B11), 10-3(C2-C11), 10-4(D2-D11),

10-5 (E2-E11), 10-6 (F2-F11), 10-7(G2-G11), 10-8 (F2-F11).

Ajouter les cellules **Véro** dans toutes les cupules, à raison de 100 ul par cupule d'une suspension de **200 000 cel./ml**.

- Incuber à 37°C dans une étuve à CO₂

- Observer tous les jours pour suivre l'évolution du tapis et noter les cupules présentant un effet **cytopathogène** jusqu'au 7^{er} jour.

- Calculer le titre par la **méthode** de Reed & Muench :

- Exemple de lecture:

- 10-1 : les 10 cupules présentent un ECP : 100%
- 10-2 : les 10 cupules présentent un ECP : 100%
- 10-3 : les 10 cupules présentent un ECP : 100%
- 10-4 : les 8 cupules présentent un ECP : 80%
- 10-5 : les 4 cupules présentent un ECP : 40%
- 10-6 : les 10 cupules ne présentent pas un ECP : 0%
- 10-7 : les 10 cupules ne présentent pas un ECP : 0%
- 10-8 : les 10 cupules ne **présentent** pas un ECP : 0%

Le titre montre la quantité de virus qui détruit 50% du tapis cellulaire, ce titre se situe entre 10-4 et 10-5 .

La méthode de Reed & Muench permet de le calculer de façon précise:

$(80-50)/(80-40) = 30/40 = 0.75$ d'où le titre $10+4+0.75 = 10+4.75$ DCP50/100 μ l ou $10+5.75$ DCP50/1ml

Le titre de virus est de $10+5.75$ DCP par ml.

La **quantité** de la suspension virale est de 10 ml d'où on peut la quantité totale de virus :

$10+5.75$ DCP50 x 10 (volume en ml) = $10+6.75$ DCP50.

D. Technique Elisa de la FVR:

La **technique** est celle **réalisée** au Centre de Référence de l'OMS pour les Recherches sur les **Arbovirus (CRORA)** de l'institut Pasteur de Dakar. Elle permet de révéler les anticorps anti FVR présents dans les **sérums** d'animaux infectés naturellement ou vaccinés contre le virus de la **FVR**. Elle permet de distinguer deux types de classes d'**immunoglobulines (Ig)**: les Ig de la classe G (**IgG**) et M (**IgM**).

1. Détection des IgG:

Déposer 100 μ l de sérum anti virus de FVR dans les cupules de la microplaque à 96 **cupules** (le sérum est un **immuno ascite** de souris dilué au $1/1000^{\circ}$ dans du tampon carbonate à pH 9),

Placer les microplaques à 4°C pendant une nuit,

Laver les plaques 3 fois dans du **PBS+0.05%** tween 20,

Déposer 100 μ l d'**antigène** viral dilué au $1/100^{\circ}$ dans du **PBS+ 0.05** tween 20 +**1%** lait écrémé,

Incuber à 37°C pendant 1 heure,

Laver les plaques 3 fois dans PBS tween 20,

Déposer 100 μ l du **sérum** suspect (contenant des **IgG**) dilué au $1/100^{\circ}$ dans **PBS+0.05%** Tween 20+**1%** lait écrémé,

Incuber à 37°C pendant 1 heure,

Laver les plaques 3 fois dans du **PBS+0.05%** Tween 20,

Déposer dans les cupules 100 μ l du conjugué au $1/500^{\circ}$ dans du **PBS+0.05%** Tween 20+**1%** Lait écrémé,

Incuber à 37°C pendant 1 heure,

Déposer 100 μ l par **cupule** de substrat **chromogène** (orthotoluidine),

Laisser agir pendant 5 mn pour faire apparaître la coloration bleue,

Bloquer la **réaction** par **dépôt** de 100 μ l par cupule d'une solution d'acide sulfurique 2N,

Lire les DO au **spectrophotomètre** à la longueur d'onde de 450 nm.

2. Détection des IgM:

Déposer 100 μ l des anticorps anti-virus de la FVR dans les cupules de la microplaque à 96 cupules (immunoascite dilué au $1/1000^{\circ}$ dans du tampon carbonate à pH 9),

Placer les plaques à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant une nuit,

Laver les plaques 3 fois dans du **PBS+0.05%** de Tween 20,

Déposer 100 μ l d'**antigène** viral dilué au $1/100^{\circ}$ dans du **PBS+0.05** tween 20+**1%** lait écrémé,

Incuber à 37°C pendant 1 heure,

Laver 3 fois dans du PBS-Tween 20,

Déposer 100 μ l du **sérum** suspect (contenant des **IgM**) dilué au $1/100^{\circ}$ dans du **PBS +0.05%** de Tween 20+**1%** lait écrémé,

Incuber à 37°C pendant 1 heure,

Laver les plaques 3 fois dans du **PBS+0.05%** de Tween 20,

Déposer 100 μ l de conjugué **Anti-IgM** d'espèce marqué à la peroxydase dilué au $1/500^{\circ}$ dans du **PBS+0.05%** Tween 20+**1%** lait écrémé,

Incuber pendant une heure à 37°C ,

Laver 3 fois dans du PBS+Tween 20,

Déposer 100 μ l par cupule du **substrat** chromogène (orthotoluidine),

Laisser agir pendant 5 mn pour apparition de coloration bleue,

Bloquer le **réaction** par **dépôt** de 100 μ l par cupule d'une solution d'acide sulfurique 2N,

Lire les DO à la longueur d'onde de 450 mn.

3. Quelques références pour réactifs pour tests Elisa et Immunofluorescence:

- Anti Goat **IgG** (whole molecule) Peroxydase conjugate, Antibody developed in **Rabbit**, Affinity isolated Antigen **specific** Antibody, Ref : A-3540.
- **Anti** Sheep **IgG** (whole molecule) Peroxydase conjugate, Antibody developed in Donkey, Affinity isolated Antigen **specific** Antibody Ref : A-34 15.
- **Anti** Bovine **IgG** (whole molecule) Peroxydase conjugate, Antibody developed in **Rabbit**, Affinity isolated Antigen specific Antibody, Ref : A-7414,

Adresse du fournisseur :

SIGMA Chemical **Compagny**, P.O.BOX 14508. ST LOUIS. MO., 63 178, U.S.A

Tel : 314 771 5750 (for orders), 314 771 5765 (for customer)

4

Annexe V:
Liste du personnel du laboratoire de virologie du CNERV de Nouakchott:

Dr Yaghouba. Kane, Dr Vétérinaire, Chef de service
Mme Ekatarina Isselmou, Technicienne
Mr Doro Sow, Assistant **d'Elevage**, technicien
Mr Mohamed Radi ould **Ethmane**, Assistant **d'Elevage**, technicien
Mr Sidina Ould Mouhamed **el** Moctar, aide de laboratoire
Mr Sidy **Mouhamed** ould moctar, aide de laboratoire

Annexe VI:

Liste du matériel existant au laboratoire de virologie du CNERV de Nouakchott

Bain marie (3)*

Bouteille à CO2 (1)

Agitateur magnétique (1), de plaque (1), de tubes(1)

Broyeur de tissus (1)

Porte filtre de 10 litres (1), de 5 litres (1),

Balance électronique (1),

Autoclave(1),

pH mètre électronique (1)

Chaîne ELISA : Lecteur, micro-ordinateur immunokan MS+ imprimante,

Compresseur-Aspirateur Marison (1),

Microscope inverse (1),

Microscope à fluorescence (1),

Congélateur horizontal -20°C electrolux (1),

Congélateur vertical-20°C(1),

Réfrigérateur (1)

Hotte à flux laminaire vertical (1)

Hotte à flux horizontal (1)

Etuve sèche Jouan (2)

Centrifugeuse réfrigérée de paillasse (3)

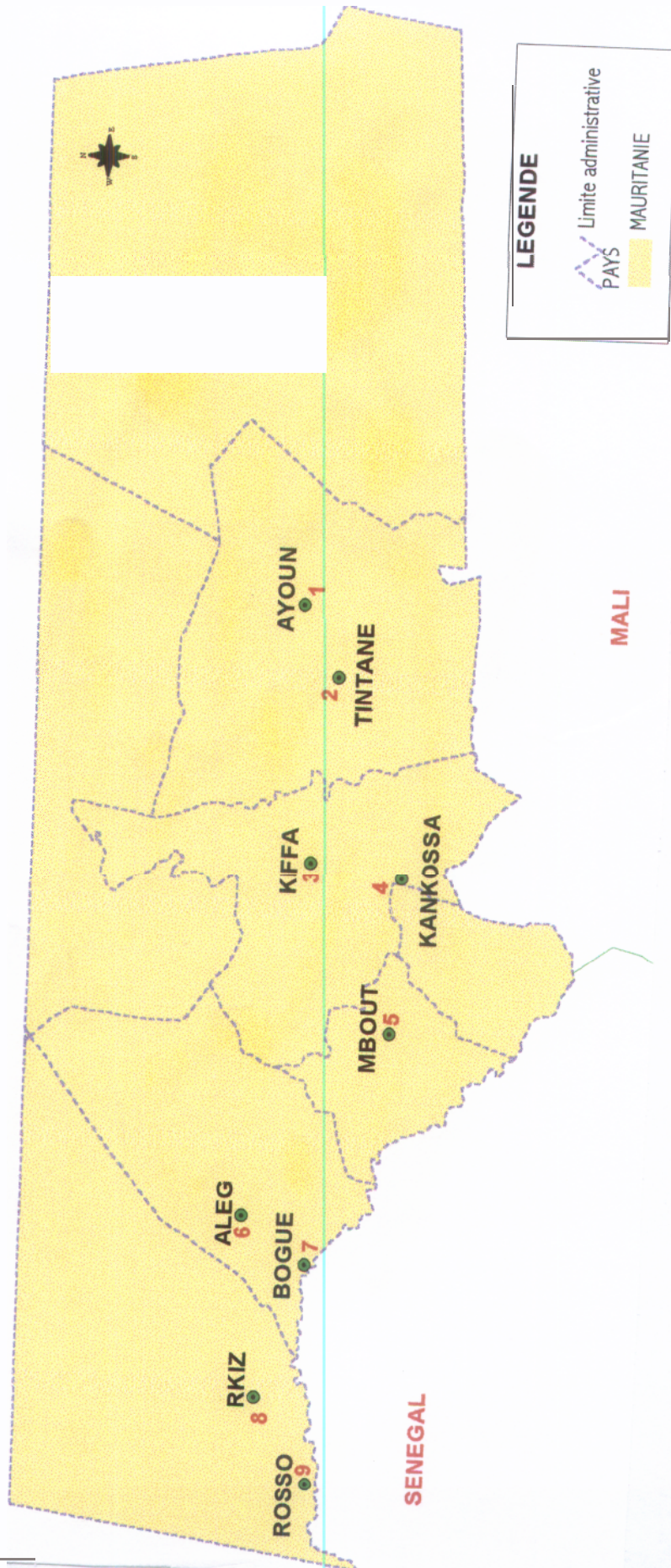
Armoire vertical métallique (1)

Distillateur d'eau (1)

Légende : (x)* = nombre de matériel fonctionnel

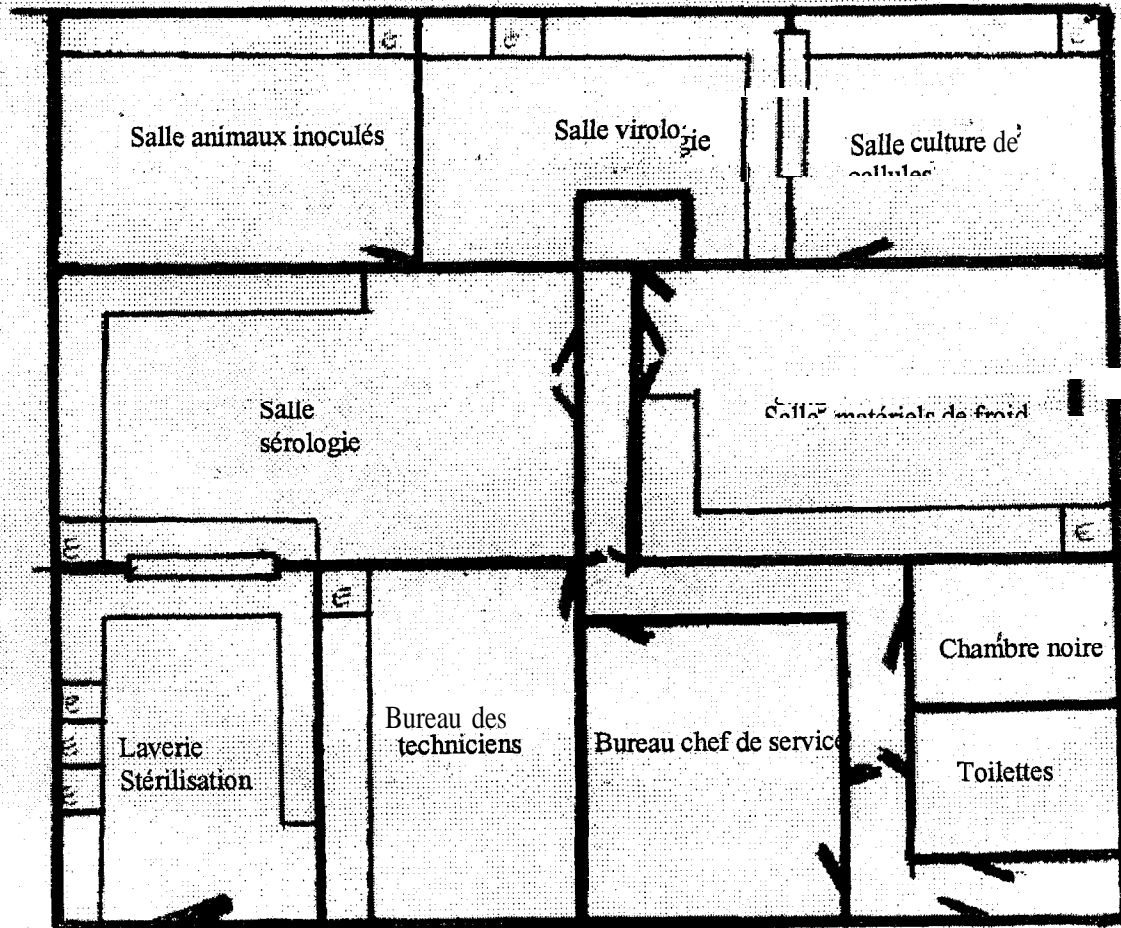
Annexe VII:

Carte de la localisation des troupeaux de ruminants sentinelles dans le sud est et le sud de la Mauritanie pour la surveillance clinique et sérologique de la fièvre de la vallée du Rift en 1998-1999.



Annexe VIII

Proposition d'organisation du Service de Virologie du CNERV



Annexe IX

Conditionnement du prélèvement suspect de la fièvre d la vallée du Rift pour son expédition au CNERV ou au laboratoire de référence

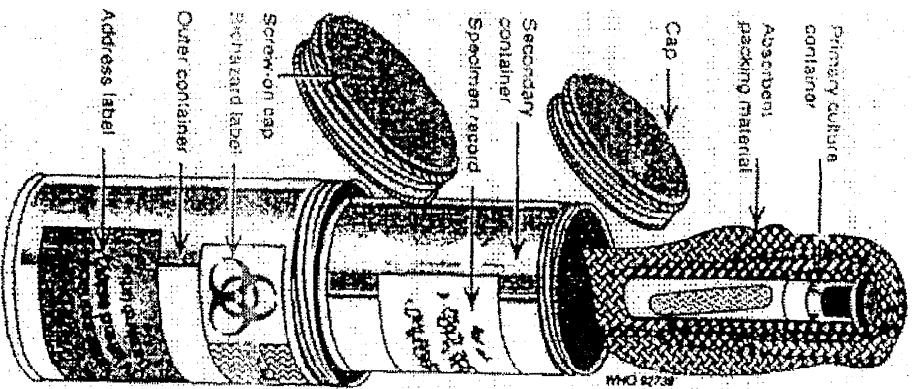


Photo N°1:

Marché de dromadaires à Nouakchott.

La **surveillance** des **animaux** des **différents** marchés de bétail (ovins, caprins bovins et camélins) à Nouakchott fait partie du **réseau** de **surveillance** des maladies animales en **général** et de la **fièvre** de la **vallée** du Rift en particulier. Un rythme mensuel de 40 **prélèvements** de sang est **prévue** entre les mois de **Février** et Décembre 1999 par le laboratoire de virologie. Le CNERV pourra ainsi **réaliser**, avec les troupeaux sentinelles **disséminés** dans les principales **zones** d'élevage, une importante **collecte** de **données** sanitaires utilisables par les responsables de la **santé** animale (la Direction des Ressources Agro-Pastorales **ou DRAP**) et des organisations de producteurs (le **Comité** Paritaire de Suivi Sanitaire ou CPSS) de **Mauritanie**.



Photo N°II:

Hotte à flux laminaire vertical

Cette Hotte est un équipement de haute **sécurité** (classe **II, BioHazard**) permettant de travailler des produits hautement infectieux comme ceux **suspects** de **FVR** au **CNERV**. De plus, elle est dotée d'un sas et d'un éclairage Ultraviolet (**U.V**) assurant la **sécurité** de l'ambiance, du **prélèvement** manipulé et du manipulateur.

Cette hotte est **située** dans une salle dont l'**étanchéité** et la **stérilité** doivent être **améliorées** par la pose de climatiseur type Split et de lampes à lumière ultraviolette (**U.V**) pour **stériliser l'atmosphère** de la salle avant et **après** la manipulation de **prélèvements** infectieux ou **suspects** de **WR**.

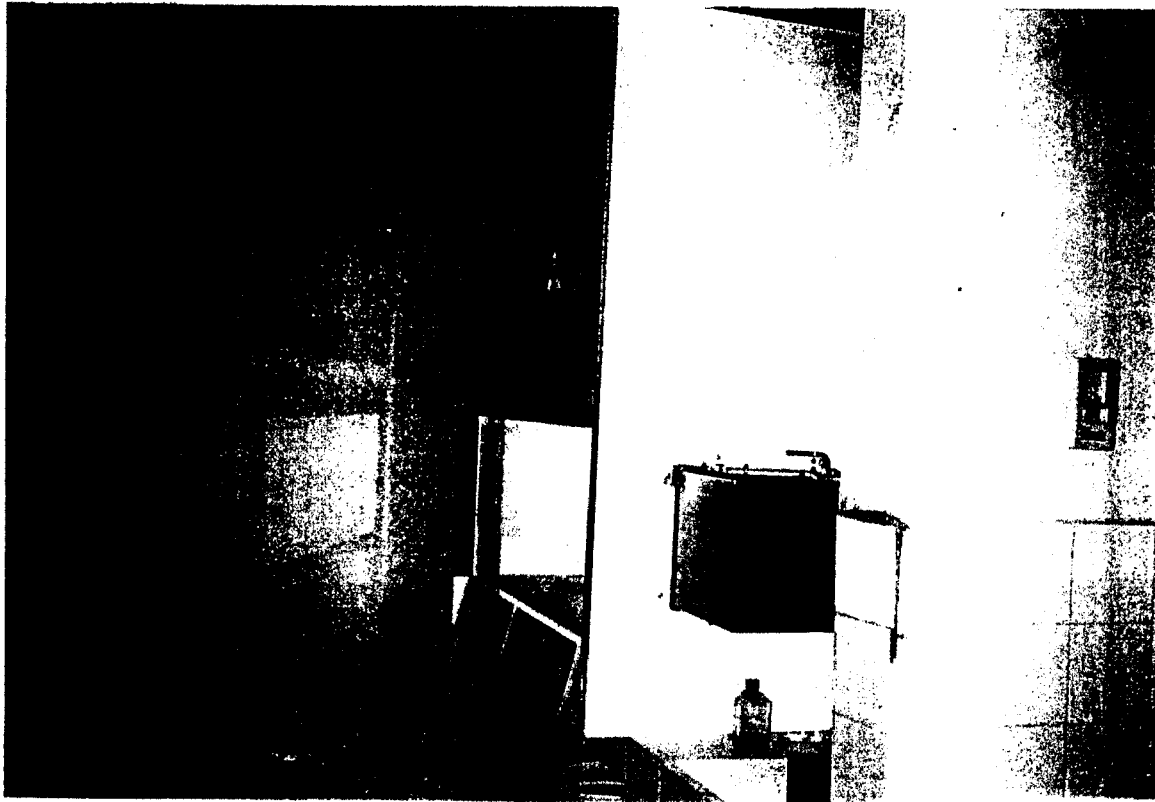


Photo N° III:

Hotte à flux laminaire horizontal.

Cette Hotte est **utilisée** pour les produits non pathogènes comme les cultures de cellules saines (cellules V&o et celluks primaires) et la préparation de milieux stériles. Elle est **destinée à protéger les cellules des contaminations extérieures**.

Cette hotte est **située** dans une salle qui présente les mêmes exigences **d'étanchéité** et de **sécurité** que la salle **réservée** au traitements de produits infectieux.

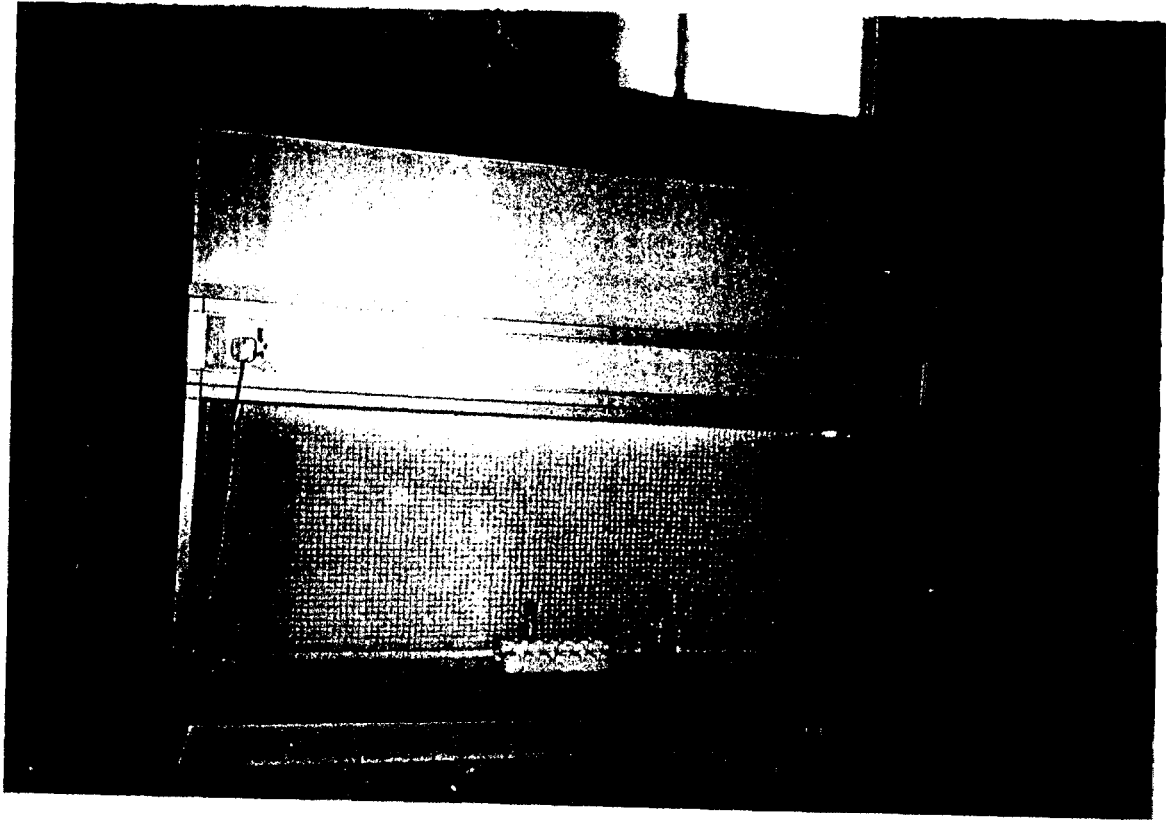


Photo **IV**:
Chaîne **Elisa**.

Cet équipement comprend (de la gauche vers la droite) une imprimante, un micro-ordinateur (avec logiciel d'analyse des **résultats**) et un lecteur. Il est utilisé actuellement pour la **réalisation** du test **Elisa** Peste bovine (test **Elisa compétition** et **immunocapture**) au CNERV. Il pourra également prendre en charge les analyses **elisa** FVR.

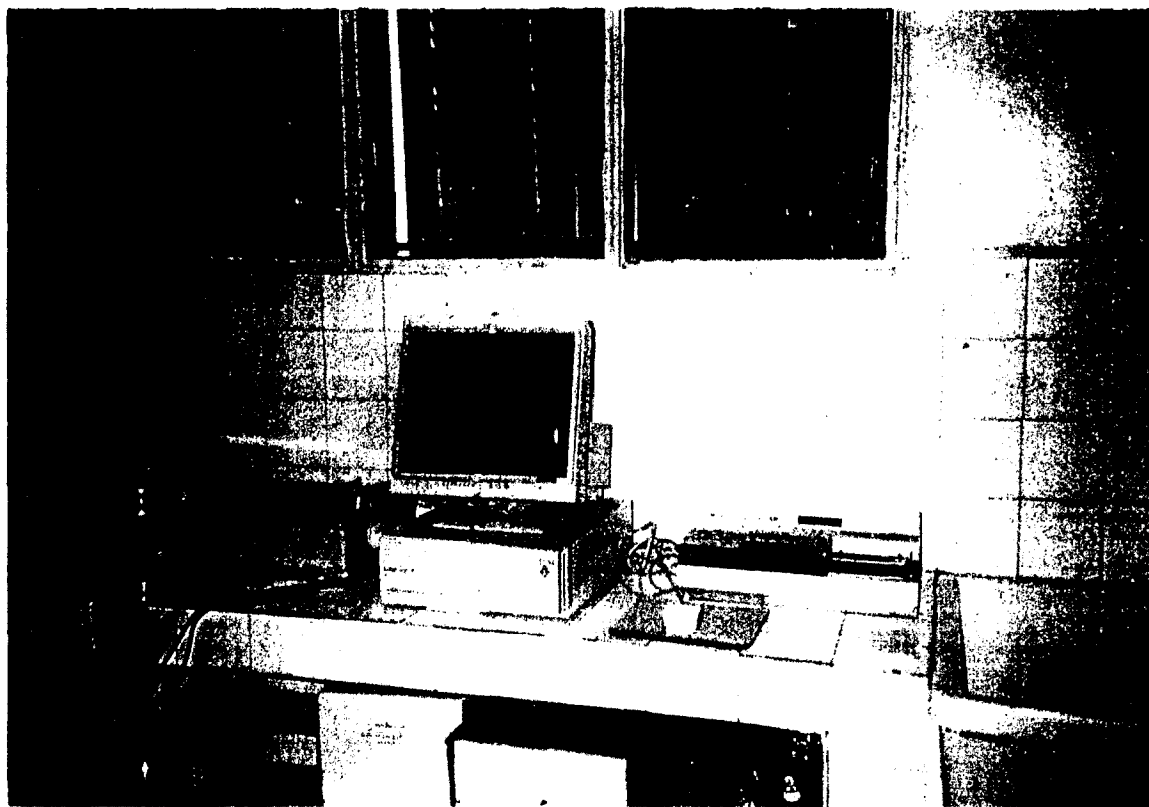


Photo v:
Distillateur d'eau

Cet appareil donne uen eau de bonne qualité et permet actuellement de **réaliser** les test **Elisa** Peste Bovine au CNERV. **Cependant**, la mise en place de test **elisa -FVR** et les cultures de cellules exige **d'acquérir** un nouvel appareil de plus grande capacité.

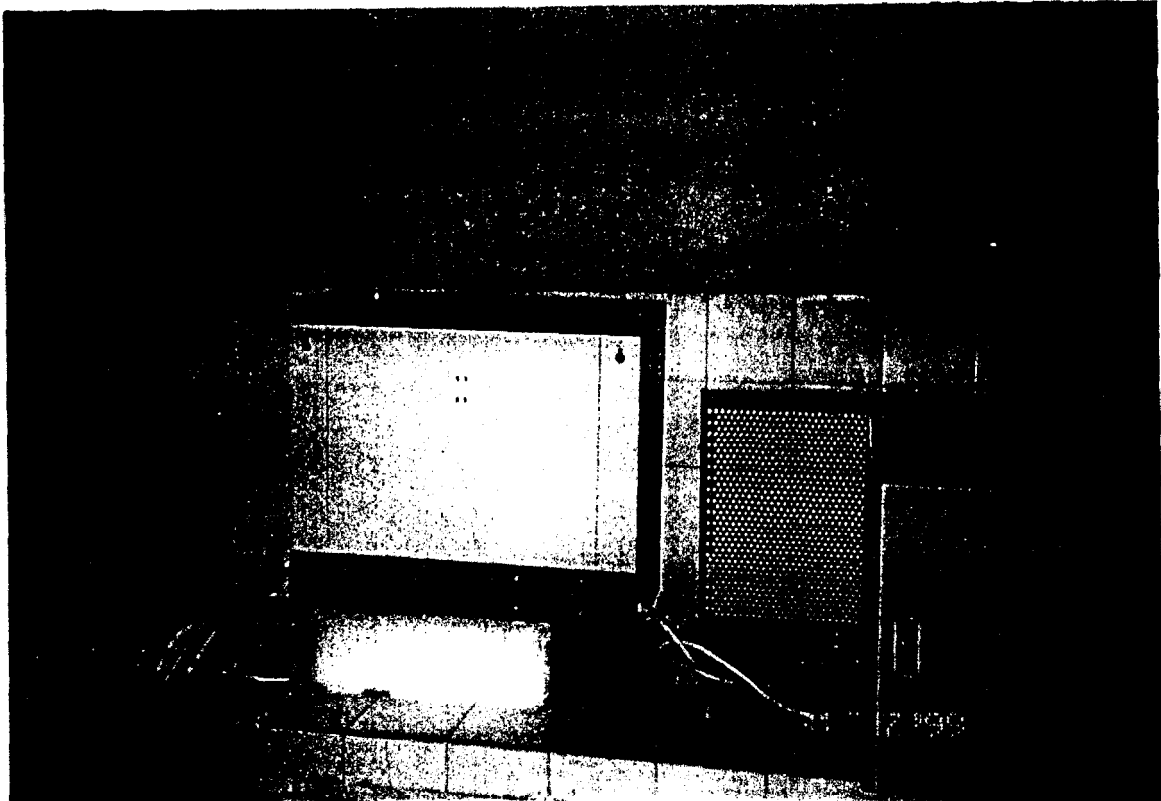


Photo VI:

Microscope à fluorescence

Ce microscope est utilisé pour le diagnostic de la rage. Il peut être employé pour le diagnostic rapide de la FVR par examen de frottis d'organes **suspects** en immunofluorescence directe.

Le déplacement de cet appareil dans une chambre noire (voir plan du laboratoire **préconisé**) facilitera l'examen et l'**interprétation** des **résultats** d'analyse au CNERV.

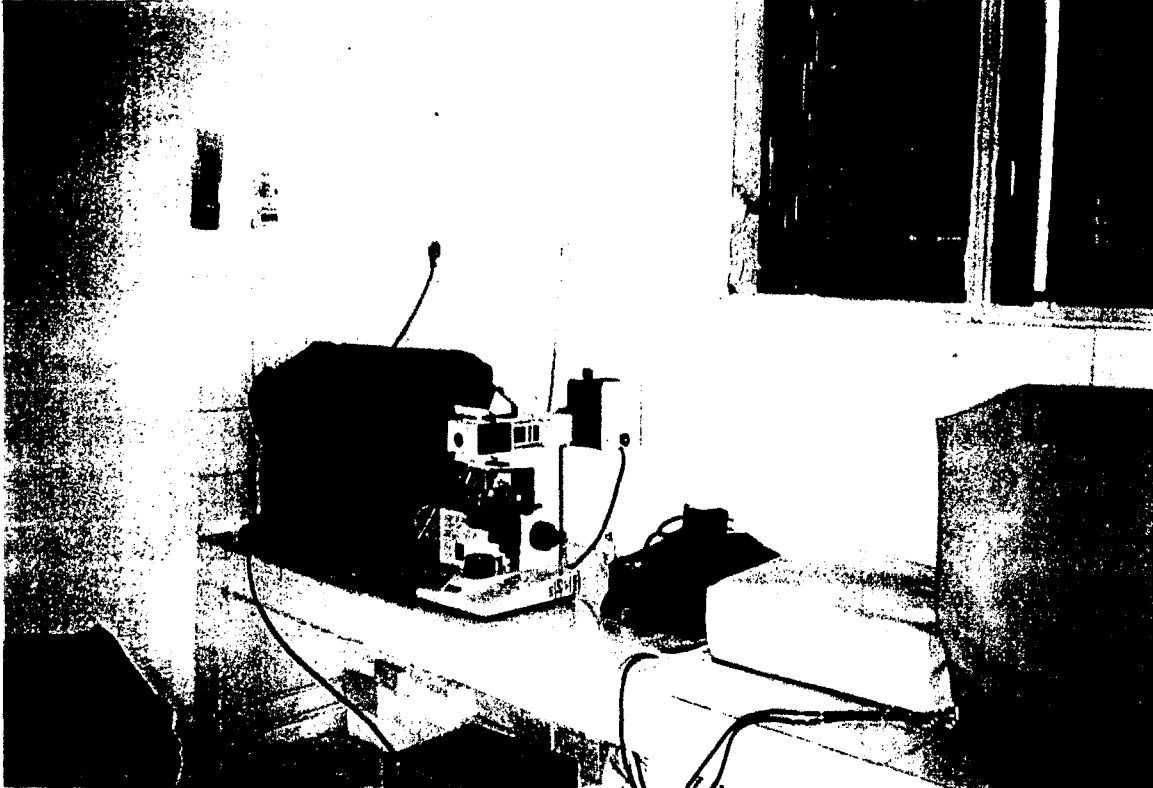


Photo VII:

Étuve sèche.

Cet appareil est destiné aux cultures de cellules mais **présente** des défaillances qui font que son remplacement par une nouvelle étuve à CO₂ est nécessaire pour la mise en place de la technique de cultures de cellules au CNERV,

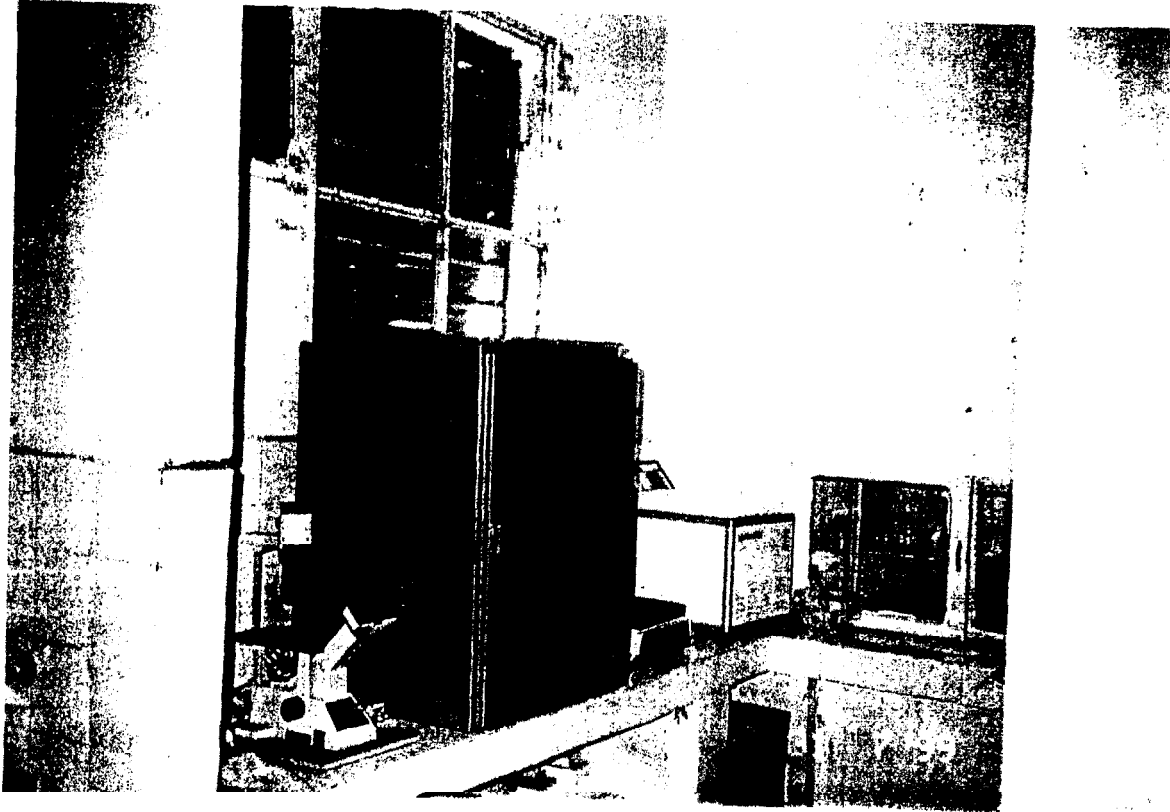


Photo VIII:

Vue partielle de la salle réservée à la sérologie

Cette salle est la plus spacieuse du laboratoire du CNERV et la pose d'une table centrale augmenterait utilement la surface de travail. Elle peut recevoir le nouvel distillateur d'eau.

