

## **Lignes directrices pour l'épreuve d'exclusion du virus de la fièvre catarrhale du mouton dans les produits biologiques vétérinaires**

Afin d'empêcher l'introduction au Canada du virus de la fièvre catarrhale dans les vaccins destinés aux ruminants, la Section des produits biologiques vétérinaires et de la biotechnologie impose aux fabricants étrangers de soumettre à une épreuve d'exclusion du virus de la fièvre catarrhale du mouton tous les vaccins à virus vivants à base de sérum de bovin ou d'autres ruminants, ou produits sur cellules primaires de bovin ou d'autres ruminants.

À la lumière de l'expérience acquise sur le terrain avec la maladie et des résultats des études en laboratoire, on comprend mieux à présent la pathogénicité, la résistance et l'immunologie du virus.

1. L'irradiation aux rayons gamma est une méthode jugée satisfaisante pour éliminer le virus de la fièvre catarrhale du sérum de bovin ou d'autres ruminants. La dose de traitement reconnue ne doit pas être inférieure à 1,5 - 2 mégarads d'irradiation du sérum congelé (-20° C) aux rayons gamma.
2. L'épreuve d'exclusion a été abandonnée pour tous les vaccins à virus vivants lorsque le milieu de culture contient du sérum irradié aux rayons gamma, exception faite des vaccins destinés aux ruminants et des vaccins produits sur des cellules primaires de bovin ou d'autres ruminants.
3. L'épreuve d'exclusion reste obligatoire pour tous les vaccins à virus vivants destinés aux ruminants lorsque le milieu de culture contient du sérum de ruminant non irradié ou lorsque le vaccin est produit sur des cellules primaires de ruminant.
4. L'épreuve d'exclusion du virus de la fièvre catarrhale du mouton mentionnée ci-haut pourrait être mise de côté pour les produits biologiques vétérinaires si les fabricants utilisent des systèmes d'assurance de la qualité pour prévenir la contamination par le virus de la fièvre catarrhale du mouton. Les épreuves de contrôle de la qualité assurances doivent être documentées dans un protocole de production approuvé. Chaque demand d'exemption sera révisée et approuvée de façon individuelle.

Les fabricants auront le choix entre les deux options suivantes lorsque les vaccins sont produits à partir de sérum non irradié ou sur des cellules primaires de ruminant (voir pièce jointe).

- a) Effectuer la présente épreuve de passage sur oeuf embryonné de poulet sur le produit final.
- b) Effectuer l'épreuve de séroconversion chez le mouton sur le produit final, sur les cellules primaires de bovins ou d'autres ruminants et sur le sérum en vrac de bovin ou d'autres ruminants.

L'épreuve d'exclusion n'est pas nécessaire dans le cas des lignées cellulaires établies.

Si le fabricant choisit de mettre à l'épreuve le sérum en vrac ou les cellules primaires au lieu du produit final, il doit mettre à l'épreuve tous les sérums et toutes les cellules primaires de ruminant qu'il utilise dans

son établissement, ce qui inclut également le sérum et les cellules utilisées dans les laboratoires de recherche ou de contrôle de la qualité.

Si le fabricant choisit d'utiliser du sérum déjà irradié pour la production de vaccin, il faut que l'ensemble du sérum de bovin ou de ruminant servant dans son établissement ait été irradié. Il faudra procéder à des vérifications des méthodes de production afin de déceler toute modification éventuelle.

## PROTOCOLE N° 1 DE DÉPISTAGE DU VIRUS DE LA FIÈVRE CATARRHALE DU MOUTON

### ÉPREUVE D'EXCLUSION DU VIRUS DE LA FIÈVRE CATARRHALE DU MOUTON À L'AIDE D'EMBRYONS DE POULET

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

##### **Inoculum**

L'inoculum du premier passage sur oeuf embryonné doit être le produit final. S'il s'agit d'un vaccin à virus vivants, choisir au hasard au moins cinq fioles de chaque série à soumettre à l'épreuve. À chaque fiole, ajouter environ 10 % du diluant stérile d'accompagnement afin de reconstituer complètement le vaccin lyophilisé et de ne pas provoquer la mort inutile d'embryons en raison d'une concentration excessive des ingrédients, dans le vaccin ainsi que dans le contenu réuni. Inoculer immédiatement après avoir reconstitué. Si le produit comprend du sérum, choisir au hasard au moins deux bouteilles de chaque série à contrôler et en réunir des parties aliquotes de volume égal.

L'inoculum du deuxième et du troisième passage est constitué uniquement des embryons prélevés et réunis, et non pas du contenu total de l'oeuf.

Les embryons peuvent être homogénéisés dans un mélangeur de verre (Ten Broeck) ou par passage pendant environ quatre minutes dans un homogénéisateur à haute vitesse, avant d'être refroidis à l'eau glacée au moyen d'une quantité minimale de diluant (environ 10 % du volume total). Centrifuger la suspension à faible vitesse dans une centrifugeuse réfrigérée (à environ 1 200 tr/mn) pendant 5 minutes, puis verser le surnageant dans un récipient refroidi afin de le conserver comme inoculum. Veiller à conserver le matériel à basse température, à le protéger de la lumière et à le traiter rapidement. Le surnageant de la suspension embryonnaire doit être dilué à raison d'une partie pour 1 000 de solution saline tamponnée aux phosphates. Ne pas congeler le matériel résiduel conservé entre les passages mais le réfrigérer, afin de pouvoir l'utiliser dans l'éventualité de résultats non concluants.

##### **Oeufs**

Incuber les oeufs de poulet pendant 8 à 12 jours à 37,5 °C. Les mirer afin de déterminer si les embryons sont viables et localiser un vaisseau sanguin à proximité de la surface de la chambre à air. Marquer l'emplacement du vaisseau sur la coquille.

Au moyen d'une petite molette électrique diamantée, découper un carré d'environ 0,5 cm de côté dans la coquille jusqu'à la membrane au niveau de la partie marquée. Si la membrane est accidentellement entamée, ajouter du collodion pour empêcher que la rupture ne s'étende.

Soulever doucement le carré de la coquille au moyen d'une pince courbe à bouts effilés.

##### **Inoculation**

La description détaillée de l'inoculation intravasculaire de l'embryon, avec illustration de techniques à

l'appui, est donnée par Foster et Luedke (1, 4) et par Goldsmit et Barzilai (2, 3).

Inoculer un nombre suffisant d'embryons afin que l'on puisse, 24 heures après, choisir pour chaque passage six embryons viables pour l'examen au cours des sept journées d'incubation. Le nombre total d'oeufs inoculés à chaque passage doit être déclaré. Les pertes journalières imputables aux traumatismes, à la contamination ou à d'autres causes doivent être consignées.

La quantité d'inoculum s'élève à 0,1 mL par oeuf. Après l'inoculation, incuber les oeufs à 33,5 °C pendant sept jours.

### OBSERVATIONS

Si l'emploi de témoins viraux positifs est une technique virologique normalisée, il n'est cependant pas recommandé dans le cas du virus de la fièvre catarrhale du mouton. En effet, on estime que le risque accru imputable à la conservation et à la manipulation du virus en laboratoire est beaucoup trop élevé par rapport à l'utilité du témoin.

Examiner quotidiennement (y compris durant les fins de semaine) les embryons inoculés des trois passages.

Les embryons qui meurent dans les 24 heures qui suivent l'inoculation peuvent être mis au rebut.

Les embryons qui meurent entre 24 et 168 heures (7<sup>e</sup> jour) après l'inoculation doivent être examinés et être inclus dans le matériel de passage constitué de tous les embryons prélevés jusqu'au 7<sup>e</sup> jour de l'incubation. Toutefois, si les embryons présentent des lésions qui évoquent le virus de la fièvre catarrhale du mouton, il faut les mettre en culture séparément. S'il apparaît que la mort des embryons ne serait pas causée par le virus de la fièvre catarrhale, il faut déterminer la cause du décès. Cela est particulièrement important lorsqu'au moins la moitié des embryons meurent. S'il y a lieu, consulter un laboratoire de diagnostic compétent.

### INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'échantillon mis à l'épreuve peut être considéré comme négatif si, à la fin du troisième passage, les six embryons sont viables ou exempts de lésions indicatrices de la présence du virus de la fièvre catarrhale du mouton.

NOTA : Les embryons morts ou moribonds qui sont infectés par le virus de la fièvre catarrhale du mouton sont habituellement de couleur rouge vif en raison d'hémorragies massives. Toutefois, il arrive souvent que les hémorragies soient minimales ou absentes.

## RÉFÉRENCES

1. Direct assay for bluetongue by intravascular inoculation of embryonating eggs. Foster NM, Luedke AJ. *Amer J Vet Res* 1968; 29 (3) : 749.
2. Isolation and propagation of a Bluetongue Virus Strain in embryonating eggs by the intravenous route of inoculation, rapport préliminaire. Goldsmit L, Barzilai E. *Refuah Veterinarith* 1965; 22 (4) : 285.
3. An improved method for the isolation and identification of Bluetongue Virus by intravenous inoculation of embryonating chicken eggs. Goldsmit L, Barzilai E. *J Comp Path* 1968; 78(4) : 477.
4. Bluetongue in sheep and cattle. Efficacy of embryonating chicken eggs in viral isolations. Foster NM et coll., *Am J Vet Res* 1972; 33 : 77.

**PROTOCOLE N° 2 DE DÉPISTAGE DU VIRUS  
DE LA FIÈVRE CATARRHALE DU MOUTON**

**ÉPREUVE D'EXCLUSION DU VIRUS DE LA FIÈVRE CATARRHALE DU MOUTON  
PAR SÉROCONVERSION CHEZ LE MOUTON**

Choisir au moins six moutons sains, bien identifiés, pratiquer un premier saignement de ces sujets et recueillir le sérum avant injection sous-cutanée du matériel d'épreuve.

Pour l'épreuve du produit final, administrer aux six moutons dix fois la dose recommandée du vaccin destiné à l'importation ou à la vente au Canada. Chaque animal doit recevoir un vaccin d'une fiole distincte de la même série de produit.

Pour l'épreuve du sérum bovin, chaque mouton doit recevoir 75 à 100 mL de la série de sérums destinés à servir à la production des produits biologiques. Chaque animal doit recevoir du sérum d'une fiole distincte de la même série.

Pour l'épreuve des cellules bovines primaires, chacun des moutons doit recevoir les cellules et le surnageant d'un récipient de culture monocouche équivalant à au moins 75 cm<sup>2</sup> que l'on aura incubé pendant 5 à 7 jours à la température optimale. Chacun des sujets doit recevoir par injection du matériel d'un récipient séparé du même lot de cellules primaires.

Quel que soit l'inoculum utilisé, chacun des moutons doit être saigné à nouveau 35 jours après l'injection. Soumettre les échantillons de sérum prélevés avant et après l'injection à un laboratoire compétent pour la mise en évidence des anticorps dirigés contre le virus de la fièvre catarrhale du mouton. Si les résultats des épreuves sont négatifs, le matériel éprouvé est acceptable.

Les résultats des épreuves susmentionnées doivent accompagner les résultats d'autres épreuves lorsque l'on soumet une demande d'importation de chaque série de produits biologiques vivants pour utilisation chez les ruminants.