

RHINOPNEUMONIE ÉQUINE

RÉSUMÉ

La rhinopneumonie équine (RE) est un terme général pour désigner plusieurs entités pathologiques, fortement contagieuses, des équidés. Les agents responsables sont les herpesvirus équins -1 et -4 (EHV-1 et EHV-4).

L'infection par l'EHV-1 ou l'EHV-4 est caractérisée par une maladie primaire du tractus respiratoire d'une gravité variable selon l'âge et l'état immunitaire de l'animal infecté. L'infection par l'EHV-1 en particulier est capable de progresser au-delà de la muqueuse respiratoire et provoque des maladies plus sévères qui peuvent se manifester par des avortements, des mortalités périnatales ou des dysfonctionnements neurologiques.

Identification de l'agent pathogène : la méthode de référence d'identification des herpesvirus responsables de la rhinopneumonie équine reste l'isolement viral à partir de prélèvements provenant d'animaux malades ou morts. L'isolement doit être complété par une confirmation sérologique de son identité. Les virus peuvent être isolés en culture de cellules à partir d'échantillons nasopharyngés prélevés sur les chevaux durant la période fébrile de l'infection, mais aussi à partir du foie, des poumons, de la rate, ou du thymus des fœtus avortés et des poulains morts précocement, et à partir des leucocytes du sang des animaux infectés par l'EHV-1. Une identification sans équivoque d'isolats viraux appartenant à l'espèce d'EHV-1 ou d'EHV-4 peut être réalisée par immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux spécifiques.

Un diagnostic d'avortement dû à l'EHV-1 peut être réalisé rapidement par détection d'antigènes viraux au moyen de l'immunofluorescence directe sur des coupes de tissus d'un avorton par l'utilisation d'un antisérum polyclonal conjugué.

Des méthodes sensibles et fiables de détection des EHV-1/4, comme une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ou le marquage par immunoperoxydase, ont été développées. Ce sont des compléments utiles aux techniques classiques de culture de virus dans le but de diagnostiquer la RE.

Les lésions histopathologiques post-mortem du à l'EHV-1 peuvent compléter le diagnostic de laboratoire. Les tissus concernés proviennent de fœtus avortés, de poulain mort juste après la naissance ou du système nerveux central des animaux affectés par la forme nerveuse.

Épreuves sérologiques : étant donné que la plupart des chevaux sont séropositifs pour les EHV-1/4, la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum collecté à partir d'un simple échantillon de sang n'est pas suffisante comme confirmation diagnostique de rhinopneumonie. Pour obtenir un diagnostic sérologique valable il faut utiliser des sérums couplés : deux prélèvements de sang doivent être réalisés sur les animaux soupçonnés d'être infectés par l'EHV-1 ou l'EHV-4, le premier en phase aiguë et le second pendant la période de convalescence. En cas d'infection, on attend une augmentation de 4 fois ou plus du titre en anticorps spécifiques. Plusieurs techniques sont utilisées : la fixation du complément (FC), la séroneutralisation du virus, ou la méthode immuno-enzymatique (ELISA).

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : des vaccins atténués et inactivés de composition variée sont disponibles sur le marché et sont utilisés pour le contrôle de la RE. Bien que la vaccination soit utile pour réduire l'incidence des avortements chez les juments, et dans l'atténuation de la sévérité des signes cliniques des infections respiratoires chez les jeunes chevaux, elle ne doit pas être considérée comme le seul moyen pour réduire le risque de rhinopneumonie en l'absence de mesures sanitaires. Comme la

durée de l'immunité induite par la vaccination est relativement courte, des rappels de vaccination à intervalle régulier sont recommandés avec chaque produit.

Les normes de production et d'autorisation des vaccins atténués et inactivés EHV sont établies par l'agence des médicaments vétérinaires appropriée dans le pays de fabrication et d'utilisation du vaccin. Un ensemble unique de normes internationales reconnues pour les vaccins EHV n'est pas disponible. Dans tous les cas, cependant, la production de vaccin est basée sur un système de plan détaillé de production employant une lignée cellulaire bien caractérisée et des lots de semences primaires de virus vaccinal identifiés et validés en ce qui concerne la sécurité, la pureté virologique, l'immunogénicité, et l'absence d'agent microbiens étrangers.

A. INTRODUCTION

La rhinopneumonie équine (RE) est une dénomination historique qui décrit un ensemble de plusieurs entités pathologiques observées chez les chevaux. Il comprend des maladies respiratoires, des avortements, des pneumonies néonatales, ou des myéloencéphalopathies (1, 2, 5, 7). Il y a environ 60 ans, la maladie a été reconnue comme une menace pour l'industrie internationale du cheval, elle est causée par deux membres de la famille des *Herpesviridae*, l'herpèsvirus équin-1 et l'herpèsvirus équin-4 (l'EHV-1 et l'EHV-4). L'EHV-1 et l'EHV-4 sont des alphaherpèsvirus très proches. Leur similitude de séquences nucléotidiques au niveau des gènes homologues se situe entre 55 % à 84 %, et les similitudes au niveau des séquences d'acides aminés de 55 % à 96 % (13, 14). Les deux herpèsvirus sont enzootiques dans tous les pays qui possèdent une population importante de chevaux et dans lesquels ils font partie intégrante des traditions culturelles et de l'économie agricole. Il n'y a pas de risque pour la santé humaine.

La RE est fortement contagieuse au sein de la population équine sensible. La transmission se fait par inhalation de sécrétions respiratoires contenant du virus. L'utilisation extensive des vaccins n'a pas éliminé les infections dues aux EHV-1/4, et les conséquences financières annuelles de cet agent pathogène à travers le monde sont importantes.

Chez les chevaux de moins de 3 ans, la rhinopneumonie s'exprime cliniquement par une maladie respiratoire aiguë et fébrile qui se répand rapidement au sein du groupe d'animaux. Le virus infecte et se multiplie dans les cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire. La période d'incubation est de 2 à 8 jours. Les premiers signes cliniques sont de la fièvre, de l'inappétence, de l'abattement et du jetage. La sévérité de la maladie respiratoire varie avec l'âge du cheval et le niveau de l'immunité résultant des vaccinations antérieures ou des expositions naturelles. Les infections subcliniques dues aux EHV-1/4 sont fréquentes, même chez les jeunes animaux. Bien que la mortalité soit rare pour la rhinopneumonie et que la guérison soit généralement complète après 1 à 2 semaines, l'infection respiratoire est une cause fréquente et non négligeable d'interruption du programme d'entraînement, de la participation aux courses, ou à d'autres compétitions équestres. L'immunité protectrice totale résultant d'une infection est de courte durée, et les animaux en convalescence sont susceptibles d'être ré-infectés par les EHV-1/4 après plusieurs mois. Les ré-infections par les deux herpèsvirus causent une maladie respiratoire moins sévère ou cliniquement inapparente, mais les risques d'avortement et/ou d'atteinte du système nerveux central ne sont pas éliminés. Les menaces cliniques les plus importantes pour les chevaux d'élevage, de course ou les chevaux de loisirs sont les conséquences abortives et nerveuses potentielles que peut provoquer une infection par l'EHV-1.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène (3)

Des méthodes de diagnostic rapides sont importantes étant donné la contagiosité de la rhinopneumonie, sa potentialité de produire une épizootie, le taux de mortalité important lors d'avortement ou de séquelles nerveuses. Plusieurs techniques de diagnostic novatrices et rapides ont été récemment décrites. Elles sont basées sur la méthode immuno-enzymatique (ELISA), des réactions d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), des marquages immunohistochimiques par peroxydase ou sur des hybridations avec des sondes d'acides nucléiques. Cependant leur utilisation est souvent réduite aux Laboratoires de référence spécialisés, c'est ainsi que la méthode de choix pour le diagnostic de la rhinopneumonie dans les laboratoires de virologie classique reste l'isolement en culture de cellules suivi par une séro-identification du virus isolé. La réussite de l'isolement des EHV-1/4 dépend du respect des méthodes en ce qui concerne le prélèvement et le traitement des échantillons par le laboratoire.

a) Récolte des échantillons

Pour un bon isolement viral, les échantillons de sécrétions nasopharyngées doivent être réalisés durant le début de la période fébrile de la maladie respiratoire. Ils sont collectés en tamponnant la région nasopharyngée via les naseaux au moyen d'une compresse de gaze de 5 × 5 cm attachée à l'extrémité d'un fil d'acier inoxydable flexible d'une longueur de 50 cm et emballé dans un tube en caoutchouc latex. Un écouvillon utérin peut aussi être utilisé. Après le prélèvement, la compresse sera enlevée de la tige et transportée immédiatement vers un laboratoire de virologie dans 3 ml de milieu de transport liquide froid (pas gelé) (milieu minimal essentiel [MEM] sans sérum et additionné d'antibiotiques). L'infectiosité peut être prolongée par l'addition d'albumine provenant de sérum bovin ou de gélatine à 0,1 % (poids/volume).

L'examen virologique des tissus d'avorton suspects d'EHV-1 se fait à partir d'échantillons de foie, de poumons, de thymus, et de rate prélevés stérilement. Les échantillons de tissus sont transportés au laboratoire et tenu à 4° C jusqu'à inoculation dans la culture de cellules. Les échantillons qui ne peuvent pas être traités dans les quelques heures seront stockés à -70 °C. Dans les cas neurologiques provoqués par l'EHV-1, le virus peut souvent être isolé à partir de la fraction leucocytaire du sang du cheval durant la phase aiguë de l'infection ou, moins souvent, à partir du nasopharynx des animaux infectés ou des animaux du troupeau. Pour les tentatives d'isolement du virus à partir des leucocytes du sang, il faut un échantillon de 20 ml de sang stérile, collecté dans un tube avec un anticoagulant citrate ou hépariné ; l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) ne doit pas être utilisé car il peut être toxique pour les cultures cellulaires). Les échantillons doivent être transportés sans délai sur de la glace (mais pas congelé) vers le laboratoire. Bien que le virus ait été isolé occasionnellement à partir de cerveau et de moelle épinière lors de mort par encéphalite due à l'EHV-1, les tentatives pour isoler le virus de cette manière sont souvent décevantes ; cependant de tels échantillons peuvent s'avérer intéressants pour une PCR.

b) Isolement du virus

Pour un isolement efficace de l'EHV-4 chez des chevaux atteints de maladie respiratoire, on doit utiliser des cultures cellulaires dérivées de cellules équines. L'EHV-1 et l'EHV-4 peuvent être isolés à partir d'échantillons nasopharyngés en inoculant des cellules fœtales de rein de cheval ou des souches de cellules fibroblastiques équines provenant du derme ou du tissu pulmonaire. L'EHV-1 peut être isolé sur d'autres types cellulaires, ce point sera discuté plus loin. L'écouvillon nasopharyngé accompagné de 3 ml de milieu de transport est transféré dans une seringue de 10 ml. Au moyen du piston de la seringue, l'écouvillon est pressé de manière à récolter le liquide dans un tube stérile. Une partie du fluide obtenu est alors filtré à travers un filtre membranaire stérile de 0,45 µm et est repris dans un second tube stérile. La filtration diminuera la contamination bactérienne, mais peut aussi faire baisser le titre viral. Des monocouches de cellules fraîchement préparées dans des boîtes de culture de tissu de 25 cm² sont inoculées d'une part avec 0,5 ml de filtrat et d'autre part avec l'extrait non filtré de l'échantillon nasopharyngé. Des cultures cellulaires dans des plaques multipuits incubées dans une atmosphère à 5 % de CO₂ peuvent aussi être utilisées. On permet au virus de s'attacher en incubant les monocouches inoculées à 37 °C pendant 1,5 à 2 h sur un plateau oscillant. Les monocouches de cellules témoins non-inoculées doivent être incubées en parallèle avec uniquement du milieu de transport stérile.

À la fin de la période d'attachement, l'inoculum est retiré et les monocouches sont rincées 2 fois avec une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) pour enlever les anticorps neutralisant le virus qui peuvent être présents dans les sécrétions nasopharyngiennes. Après addition de 5 ml de milieu de maintenance supplémenté (MEM contenant 2 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 2 fois la concentration de base en antibiotiques (pénicilline, streptomycine, gentamycine, et amphotéricine B), les boîtes sont incubées à 37 °C. L'utilisation d'un échantillon témoin de virus positif pour valider la procédure d'isolement comporte un risque dû au fait que cela peut conduire à une éventuelle contamination des échantillons à diagnostiquer. Ce risque peut être minimisé en utilisant les précautions de routine et une bonne technique de laboratoire, par l'utilisation d'une hotte à flux laminaire, en inoculant les témoins positifs après les échantillons à diagnostiquer, en décontaminant les surfaces de la hotte après l'adsorption du virus et en utilisant un témoin positif de bas titre. Les boîtes inoculées devront être inspectées chaque jour par microscopie pour repérer l'effet cytopathogène (ECP) caractéristique des herpèsvirus (cellules qui s'arrondissent, qui augmentent en réfraction et qui se détachent). Les cultures qui ne montrent aucune évidence d'ECP viral après une semaine d'incubation doivent être passées à l'aveugle dans des monocouches cellulaires fraîchement préparées, utilisant des petits aliquots du surnageant et des cellules déjà passées. Des passages en aveugle supplémentaires ne sont souvent pas productifs.

Différents types cellulaires peuvent être utilisés pour isoler l'EHV-1 de tissus d'avortons ou de cas morts d'encéphalite (ex : cellules de reins de lapin [RK-13], de reins d'hamster [BHK-21], de reins de bovin Madin-Darby [MDBK], de reins de porc [PK-15], etc.), mais les cultures dérivées de cellules équines sont les plus sensibles et doivent être utilisées si des cas peu fréquents d'avortement dus à l'EHV-4 ont été détectés. Un homogénat comprenant 10 % de tissu du foie, du poumon, du thymus et de la rate (de fœtus avortés) ou du tissu du système nerveux central (de cas d'encéphalite) sont utilisés pour l'isolement. Ceux-ci sont préparés par un premier hachage en petits échantillons de tissus de 1 mm³ dans une boîte de Petri stérile

avec des ciseaux de dissection, suivis par une macération des cubes de tissus dans un milieu de culture sans sérum avec des antibiotiques au moyen d'un broyeur mécanique de tissus (ex. Ten-Broeck ou Stomacher). Après centrifugation à 1 200 **g** pendant 10 min, le surnageant est retiré et 0,5 ml sont inoculés en double sur une monocouche de cellules dans des boîtes de 25 cm². Ensuite les cellules inoculées sont incubées à 37 °C pendant 1,5 à 2 h, l'inoculum est retiré et les monocouches sont rincées 2 fois avec du PBS. Après addition de 5 ml de milieu de maintenance supplémenté, les fioles sont incubées à 37 °C pendant plus d'une semaine ou jusqu'à l'observation d'un ECP.

La mise en culture de leucocytes périphériques du sang peut être tentée dans le but de détecter l'EHV-1 chez le cheval au cours de la phase précoce de la myélo-encéphalite. La fraction leucocytaire (*buffy coat*) peut être préparée à partir de sang non coagulé par centrifugation à 600 **g** pendant 15 min, puis récupérée après que le plasma ait été retiré délicatement. Le *buffy coat* est alors placé sur un coussin de Ficoll 1.090, et centrifugé à 400 **g** pendant 20 min. L'interface riche en leucocytes est prélevée et déposée sur un coussin de Ficoll 1.077 et centrifugée de la même façon. L'interface (sans la plupart des granulocytes) est lavée 2 fois dans du PBS (300 **g** pendant 10 min) et resuspendue dans 1 ml de MEM contenant 2 % de SVF. Alors, 0,5 ml de suspension cellulaire rincée est ajoutée en double à une monocouche de fibroblastes équins ou de cellules fœtales équines ou encore de cellules de RK-13 dans des boîtes de 25 cm² contenant 8 à 10 ml de milieu de maintenance fraîchement ajouté. Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 7 jours ; l'inoculum n'est pas retiré. Vu que l'ECP peut être difficile à détecter en présence de l'inoculum massif de leucocytes, chaque boîte de cellules est gelée et décongelée après 7 jours d'incubation et les contenus sont centrifugés à 300 **g** pendant 10 min. Finalement, 0,5 ml du surnageant du milieu sont transférés sur des monocouches cellulaires fraîchement préparées et qui viennent d'arriver à confluence. Celles-ci sont incubées et observées pour l'ECP viral pendant au moins 5 à 6 jours avant d'être considérées comme négatives.

c) Confirmation sérologique de l'identité du virus

Le principe de base de l'identification de tout herpèsvirus isolé d'échantillons testés provenant de cas suspect de rhinopneumonie est leur réactivité immunologique avec un antisérum spécifique. L'identification spécifique d'un isolat comme l'EHV-1 ou l'EHV-4 peut être rapidement et facilement réalisée grâce à une détection d'un antigène viral dans les cultures de cellules infectées par immunofluorescence (IF) en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques (AcMs). Ces derniers sont disponibles dans les Laboratoires de références de l'OIE spécialisés dans le diagnostic de la rhinopneumonie équine. Cette épreuve, qui est spécifique et précise, peut être réalisée sur un petit aliquot de cellules inoculées avec du matériel infectieux de cas clinique ou d'autopsie. Un isolat obtenu dans un laboratoire ne possédant ni d'AcMs ni d'équipement pour une épreuve d'IF peut être identifié comme EHV-1/4 par séroneutralisation virale en utilisant soit un antisérum polyclonal spécifique du virus, soit la PCR (voir section B.1.f).

Les monocouches cellulaires infectées avec l'isolat sont enlevées par raclage quand au moins 75 % d'ECP sont observés. Les cellules sont centrifugées hors du milieu de culture et resuspendues dans 0,5 ml de PBS. 50 µl de la suspension cellulaire sont placés dans deux puits d'une plaque multi-puits, séchés à l'air, et fixés pendant 10 min avec de l'acétone 100 %. Les suspensions cellulaires témoin (non infectées, infectées par l'EHV-1, ou infectées par l'EHV-4) sont aussi déposées sur la même plaque. Les cellules témoins peuvent être préparées à l'avance et stockées au congélateur dans de petits aliquots. Une goutte d'une dilution appropriée d'AcMs spécifiques de l'EHV-1 est ajoutée à un puits de chaque paire de suspension cellulaire, et une goutte d'AcMs spécifiques de l'EHV-4 est ajoutée à chacun des autres puits. Après 30 min d'incubation à 37 °C dans une chambre humide, les anticorps qui n'ont pas réagi sont enlevés par deux lavages de 10 min avec du PBS. Les AcMs liés aux antigènes viraux peuvent être détectés avec des IgG de chèvre anti-souris conjugués avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Une goutte de diluant conjugué est ajoutée à chaque puits et, après 30 min à 37 °C, les puits sont à nouveau lavés 2 fois avec du PBS. Les cellules sont examinées avec un microscope à fluorescence. Une fluorescence positive avec l'anticorps spécifique indique le type de virus.

d) Détection du virus par immunofluorescence directe

La détection d'antigène de l'EHV-1 par immunofluorescence directe dans des échantillons de tissus récoltés provenant d'avortons de cheval constitue une méthode indispensable pour les laboratoires de diagnostic vétérinaire dans le but d'obtenir un diagnostic préliminaire rapide d'avortement à herpèsvirus (9). La comparaison des techniques d'immunofluorescence et d'isolement en culture de cellules sur plus de 100 cas d'avortements équins ont fourni la preuve que la fiabilité du diagnostic par immunofluorescence directe sur du tissu fœtal obtenu à l'autopsie est équivalente à celle des épreuves d'isolement viral à partir du même tissu. Aux États-Unis d'Amérique (USA), un puissant antisérum polyclonal spécifique de l'EHV-1, préparé à partir de porcs et conjugué avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), est fourni aux laboratoires de diagnostic vétérinaire par les Laboratoires des Services Vétérinaires Nationaux du Département de l'agriculture des USA (USDA). L'antisérum réagit avec l'EHV-4 et en conséquence ne peut pas être utilisé pour le sérotypage. Des échantillons fraîchement disséqués (pièces de 5 × 5 mm) de tissu fœtal (poumons, foie, thymus, et rate) sont congelés, sectionnés au cryostat à -20 °C, montés sur une lame

pour microscopie, et fixés dans de l'acétone 100 %. Après séchage à l'air, les coupes sont incubées à 37 °C dans une atmosphère humide pendant 30 min avec une dilution appropriée d'anticorps conjugués de porc contre l'EHV-1. Les anticorps qui n'ont pas réagi sont enlevés par deux lavages dans du PBS. Les coupes de tissus sont alors couvertes d'une solution aqueuse et d'une lame couvre-objet, et examinées. Les cellules fluorescentes indiquent la présence d'antigène d'EHV. Chaque épreuve doit inclure un témoin positif et négatif consistant en une coupe de tissus fœtal de statut connu infecté ou non-infecté par l'EHV-1.

e) Détection du virus par coloration au moyen d'une immunoperoxydase

Des méthodes de coloration immunohistochimique (IH) enzymatique (ex. immunoperoxydase) ont été développées récemment comme procédure pour détecter les antigènes de l'EHV-1 dans des tissus inclus dans de la paraffine provenant de poulains avortés ou de chevaux avec une atteinte nerveuse (12, 20). De telles techniques auxiliaires d'IH pour la détection d'antigènes peuvent faciliter l'identification du virus dans des échantillons de tissus archivés ou des cas cliniques pour lesquels les méthodes de laboratoire traditionnelles pour la détection de l'EHV-1 ont échoué. Des colorations immuno-enzymatiques spécifiques de l'EHV-1 sont particulièrement utiles pour l'identification simultanée des lésions morphologiques et de l'agent infectieux. La coloration à l'immunoperoxydase pour EHV-1 ou EHV-4 peut aussi être réalisée sur des cultures cellulaires infectées (16). Des témoins adéquats doivent être inclus avec chaque test d'immunoperoxydase pour l'évaluation de la spécificité de la méthode et la spécificité des anticorps.

f) Détection du virus par réaction de polymérisation en chaîne

La PCR peut être utilisée pour une détection rapide d'acides nucléiques des EHV-1 et -4 dans des échantillons cliniques, dans des tissus archivés inclus dans de la paraffine, ou à partir de cultures de cellules inoculées en vue d'isolement viral (4, 10, 11, 17, 18). Plusieurs amorces spécifiques ont été mises au point pour distinguer la présence de l'EHV-1 et de l'EHV-4. La corrélation entre la PCR et les techniques d'isolement viral pour le diagnostic de l'EHV-1 et l'EHV-4 est valable (17). Le diagnostic de la rhinopneumonie par PCR est rapide, sensible et ne dépend pas de la présence de virus infectieux dans l'échantillon clinique. Elle fait maintenant partie intégrante de l'éventail des épreuves couramment disponibles pour diagnostiquer la rhinopneumonie, chacune présentant ses propres avantages et limites.

Pour le diagnostic d'une infection aiguë par les EHV, les méthodes de PCR sont très efficaces avec des échantillons d'avortons ou d'écouvillon nasopharyngé et de leucocytes du sang périphérique de poulains ou de yearlings ; elles sont particulièrement utiles dans les avortements épizootiques explosifs ou les maladies du tractus respiratoire dans lesquels une identification rapide du virus est primordiale pour orienter les stratégies de gestion. Les PCR réalisées sur de la moelle épinière, du tissu cérébral ou encore des leucocytes du sang périphérique sont importantes lorsque l'on cherche à poser un diagnostic sur un cheval avec des symptômes nerveux. Cependant, l'interprétation de l'amplification par PCR de fragments génomiques de l'EHV-1 ou de l'EHV-4 à partir des tissus de chevaux adultes (nœuds lymphatiques ou ganglion trijumeau) est difficile en raison de la forte prévalence d'infections latentes à EHV-1 et EHV-4 dans ces tissus (19).

Une réaction de PCR multiplex en une étape pour la détection simultanée de l'EHV-1 et de l'EHV-4 a été décrite (18). Un protocole plus sensible par PCR nichée de l'EHV-1 ou de l'EHV-4 à partir d'échantillons cliniques ou pathologiques (sécrétions nasales, leucocytes sanguins, cerveau et moelle épinière, tissus fœtaux, etc.) est décrite ci-dessous (4). Ce protocole a été utilisé avec succès ; cependant, la technologie dans ce domaine évolue rapidement, et des techniques plus simples et plus sensibles seront bientôt disponibles.

i) *Préparer l'ADN matrice à partir de l'échantillon à tester* : après homogénéisation de l'échantillon et des cellules lysées en présence d'un sel chaotropique, les acides nucléiques sont liés sélectivement à des substrats résine de type silica ou cationique. Les acides nucléiques liés aux substrats sont purifiés dans une série d'étapes de lavages rapides suivie par la récupération au moyen d'une phase d'éluion avec une solution faiblement concentrée en sel. Les réactifs nécessaires pour l'extraction rapide d'acides nucléiques sont disponibles sous forme de kit de diagnostic auprès de différentes firmes (ex. High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, USA ; QIAamp DNA, Qiagen, Valencia, USA).

ii) *Séquences spécifiques d'amorces pour la PCR nichée de l'EHV-1* (sur la base de celles décrites dans la référence 4) :

BS-1-P1 = 5'-TCT-ACC-CCT-ACG-ACT-CCT-TC-3' (917-936)

gB1-R-2 = 5'-ACG-CTG-TCG-ATG-TCG-TAA-AAC-CTG-AGA-G-3' (2390-2363)

BS-1-P3 = 5'-CTT-TAG-CGG-TGA-TGT-GGA-AT-3' (1377-1396)

gB1-R-a = 5'-AAG-TAG-CGC-TTC-TGA-TTG-AGG-3' (2147-2127)

- iii) *Séquences spécifiques d'amorces pour la PCR nichée de l'EHV-4 (4) :*
 BS-4-P1 = 5'-TCT-ATT-GAG-TTT-GCT-ATG-CT-3' (1705–1724)
 BS-4-P2 = 5'-TCC-TGG TTG-TTA-TTG-GGT-AT-3' (2656–2637)
 BS-4-P3 = 5'-TGT-TTC-CGC-CAC-TCT-TGA-CG-3' (1857–1876)
 BS-4-P4 = 5'-ACT-GCC-TCT-CCC-ACC-TTA-CC-3' (2456–2437)
- iv) *Conditions de PCR pour la première étape d'amplification :* l'ADN matrice de l'échantillon à tester (1 à 2 µg dans 2 µl) est ajouté à un mélange PCR (volume total de 50 µl) contenant du tampon PCR ×1 (50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, pH 9,0, 0,1 % Triton X-100), 200 µM de chaque désoxynucléotide triphosphate (dNTP), 2,5 mM MgCl₂, 2,0 µM de chaque amorce extérieure (BS-1P-1 et gB1-R-2 pour la détection de l'EHV-1 et, dans un mélange séparé, BS-4-P1 et BS-4-P2 pour la détection de l'EHV-4) et 0,5 Unité de Taq ADN polymérase. Les paramètres d'amplification sont : la dénaturation initiale à 94 °C pendant 4 min ; 40 cycles à 94 °C pendant 30 s, une étape à 60 °C pendant 30 s, et une étape à 72 °C pendant 90 s ; suivi d'une extension finale à 72 °C pendant 10 min. Des mélanges réactionnels séparés soit contenant l'ADN viral connu, soit sans ADN doivent être préparés et amplifiés comme témoin positif et négatif.
- v) *Les conditions de PCR pour la deuxième étape d'amplification (nichée) :* 2 µl d'une dilution à 1/10 du produit de la première amplification sont ajoutés à un mélange frais de PCR (volume total 50 µl) contenant le tampon PCR ×1, 200 µM de chaque dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 2,0 µM de chaque amorce (BS-1-P3 et gB1-R-a pour la détection de l'EHV-1 et dans un mélange réactionnel séparé, BS-4-P3 et BS-4-P4 pour la détection de l'EHV-4) et 0,5 u de Taq ADN polymérase. Les paramètres sont : dénaturation initiale à 94 °C pendant 4 min ; 40 cycles de 94 °C pendant 30 s, 60 °C pendant 30 s, et 72 °C pendant 1 min ; avec une extension finale à 72 °C pendant 10 min.
- vi) *Analyse par électrophorèse des produits amplifiés :* 10 µl de chaque produits finaux amplifiés, incluant les témoins, sont mélangés avec 2 µl de colorant concentré 6 fois et analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % dans un tampon Tris/acétate, avec un marqueur de taille moléculaire de 100 pb. Le gel est baigné dans une solution de bromure d'éthidium et soumis à une transillumination aux UV pour permettre la visualisation des produits amplifiés de 770 pb pour l'EHV-1 ou 580 pb pour l'EHV-4.

g) Histopathologie

L'examen histopathologique de coupes de tissus d'avortons ou de chevaux affectés neurologiquement fixés et intégrés dans de la paraffine constitue une partie importante du diagnostic de laboratoire de ces deux manifestations cliniques de la rhinopneumonie. Chez les avortons, la présence de corps d'inclusion intranucléaire typiques des herpesvirus au niveau de l'épithélium des bronchioles ou dans les cellules en périphérie des zones de nécrose hépatique sont des lésions pathognomoniques de l'EHV-1. Une caractéristique non pathognomonique des lésions microscopiques associées à l'encéphalite due à l'EHV-1 est une angéite thrombosante dégénérative des petits vaisseaux sanguins dans le cerveau ou la moelle épinière (manchons périvasculaires et infiltration par des cellules inflammatoires, prolifération et nécrose endothéliale, et formation de thrombus).

2. Épreuves sérologiques

En raison de l'ubiquité des agents viraux responsables de la rhinopneumonie et de la forte prévalence parmi les chevaux dans la plupart des régions du monde, la détection d'un titre en anticorps négatif envers les EHV-1/4 par des dosages sérologiques chez des chevaux destinés à l'exportation n'est pas reprise dans les règlements vétérinaires qui visent à prévenir la dispersion internationale des maladies infectieuses des chevaux. Les épreuves sérologiques peuvent, cependant, être une procédure complémentaire utile pour assister le diagnostic de la rhinopneumonie chez les chevaux. Le diagnostic sérologique de la rhinopneumonie est basé sur la démonstration d'une augmentation significative du titre en anticorps dans des sérums couplés, pris durant la phase aiguë et la période de convalescence de la maladie. Les résultats des épreuves réalisées sur sérum provenant d'une seule collecte, dans la plupart des cas, sont impossibles à interpréter avec un niveau de confiance satisfaisant. L'échantillon de sérum initial (phase aiguë) doit être prélevé aussi tôt que possible après le début des signes cliniques, et le second (période de convalescence) doit être pris 2 à 4 semaines plus tard. Des sérums (phase aiguë) de juments après avortement ou de chevaux avec une encéphalite à l'EHV-1 peuvent déjà contenir un titre maximal en anticorps contre l'EHV-1, avec aucune augmentation détectable du titre dans les sérums récoltés à des dates ultérieures. Dans de tels cas, les sérologies couplées à partir d'échantillons pris sur des membres du troupeau non affectés cliniquement pour repérer une augmentation du titre en anticorps contre les EHV-1/4 peut fournir une information utile pour un diagnostic rétrospectif de rhinopneumonie dans le troupeau. Enfin, la détection sérologique d'anticorps contre l'EHV-1 dans le sang cardiaque ou ombilical ou d'autres liquides de fœtus équin peut avoir une valeur diagnostique pour l'EHV-1 dans de rares cas où les avortons sont virologiquement négatifs ; dans certains cas il est possible de mettre en évidence le génome des virus EHV 1/4 par PCR.

Le titre en anticorps sériques contre les EHV-1/4 peut être déterminé par ELISA (8), séroneutralisation (SN) (15), ou un test de fixation du complément (FC) (15). Comme il n'y pas de réactifs reconnus internationalement ou de techniques normalisées pour réaliser les épreuves de diagnostic sérologique pour la détection d'anticorps contre les EHV-1/4, les déterminations des titres en anticorps sur le même sérum peuvent différer d'un laboratoire à l'autre. Par ailleurs, toutes les épreuves sérologiques mentionnées détectent les anticorps qui ont une réactivité croisée entre l'EHV-1 et l'EHV-4. Néanmoins, la démonstration, par ces épreuves, d'une augmentation du titre en anticorps de 4 fois ou plus durant le cours de la maladie fournit la confirmation sérologique d'une infection récente avec un des virus. Les tests de FC et l'ELISA ont l'avantage de fournir des résultats plus rapidement et de ne pas demander de culture cellulaire. Récemment, un ELISA type spécifique qui peut faire la distinction entre les anticorps contre l'EHV-1 et l'EHV-4 a été développé et est commercialement disponible (6). Le test de microneutralisation est une épreuve sérologique largement utilisée et sensible pour la détection des anticorps contre les EHV-1/4 et sera donc décrite ici.

a) Test de séroneutralisation du virus

Ce test sérologique est plus communément réalisé dans une plaque de microtitrage de 96 puits (culture de tissus calibrée) utilisant une dose constante de virus et des dilutions double des sérums équins à tester. Il faut au moins deux puits répétés pour chaque dilution de sérum. Du sérum sans MEM est utilisé comme diluant. Des stocks de virus de titre connu sont dilués juste avant l'utilisation pour contenir 100 DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) dans 25 µl. Des monocouches de cellules E-Derm ou RK-13 sont dispersées avec de l'EDTA/trypsine et resuspendues à une concentration de 5×10^5 /ml. Remarquez que les cellules RK-13 peuvent être utilisées avec l'EHV-1 mais ne donne pas un ECP clair avec l'EHV-4. Des sérums témoins équins positif et négatif en anticorps, des contrôles de viabilité des cellules, des contrôles d'infectivité du virus, et le test de cytotoxicité du sérum, doivent être inclus dans chaque épreuve. Enfin les titres de virus neutralisant les anticorps sont calculés en déterminant la réciprocity de la plus haute dilution de sérum qui protège 100 % de la monocouche cellulaire de la destruction virale dans chacun des deux puits répétés.

Le protocole convenable du test est comme suit :

- i) Inactiver les sérums à tester et les sérums témoins en les plaçant 30 min dans un bain d'eau à 56 °C ;
- ii) Ajouter 25 µl de sérum sans MEM à tous les puits de la plaque de microtitrage ;
- iii) Pipeter 25 µl de chaque sérum test dans les puits dupliqués des deux rangées A et B de la plaque. La première rangée sert comme témoin de toxicité du sérum et la seconde rangée comme la première dilution du test. Faire des dilutions doubles de chaque sérum de départ avec la rangée B et en commençant du fond de la plaque par mélange séquentiel et transfert de 25 µl à chaque rangée de puits suivante. Six sérums peuvent être testés dans chaque plaque ;
- iv) Ajouter 25 µl du stock de virus dilué d'EHV-1 ou d'EHV-4 à chaque puits (100 DICT₅₀/puits) excepté ceux des rangées A, qui sont les puits des sérums témoins pour la surveillance de la toxicité du sérum envers les cellules indicatrices. Remarquez que les dilutions finales de sérum, après addition de virus, tournent autour de 1/4 à 1/256 ;
- v) Une plaque témoin séparée doit inclure : le titrage des sérums de chevaux positifs et négatifs de titre connu, des cellules témoins (pas de virus), un virus témoin (pas de sérum) et un titrage viral pour calculer la quantité réel de virus utilisée dans le test ;
- vi) Incuber les plaques pendant 1 h à 37 °C dans une atmosphère de 5 % en CO₂ ;
- vii) Ajouter 50 µl de la suspension préparée de cellules E-Derm ou RK-13 (5×10^5 cellules/ml) dans du MEM 10 % contenant du sérum fœtal de veau à chaque puits ;
- viii) Incuber les plaques pendant 4 à 5 jours à 37 °C en atmosphère de 5 % de CO₂ ;
- ix) Examiner l'ECP sur les plaques au microscope et enregistrer les résultats sur une feuille de travail. Alternativement, la monocouche cellulaire peut être cotée pour son ECP après fixation et coloration comme suit : après retrait du milieu de culture, immerger la plaque pendant 15 min dans une solution contenant 2 mg/ml de crystal violet, 10 % de formol, 45 % de méthanol, et 45 % d'eau. Ensuite, rincer les plaques vigoureusement sous un jet d'eau du robinet ;
- x) Les puits contenant une monocouche cellulaire intacte sont colorés en bleu, alors que les monocouches détruites par le virus ne sont pas colorées. Vérifier que les cellules témoins, le sérum témoin positif, et le contrôle de la cytotoxicité du sérum soient colorés en bleu, que le virus témoin et le sérum témoin négatif ne soient pas colorés, et que la quantité réel de virus ajoutée à chaque puits est entre $10^{1,5}$ et $10^{2,5}$ DICT₅₀. Les puits sont notés comme positifs à la neutralisation du virus si 100 % de

la monocouche cellulaire reste intacte. La plus haute dilution de sérum résultant en une neutralisation complète du virus (pas d'ECP) dans les deux puits répliqués est le titre dilution-finale pour ce sérum ;

- xi) Calculer le titre neutralisant pour chaque sérum testé, et comparer les titres de la phase aiguë et de convalescence pour chaque animal. L'animal est considéré positif quand on observe une augmentation de 4 fois ou plus du titre.

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

Des vaccins atténués et inactivés sont disponibles. Ils sont préparés, commercialisés et utilisés comme aide prophylactique car ils permettent de réduire la charge de la maladie chez les chevaux infectés par les EHV-1/4. L'expérience clinique a démontré qu'il ne faut compter sur aucune des préparations vaccinales pour fournir un degré absolu de protection contre la rhinopneumonie. Des doses multiples, répétées annuellement, de chacun des vaccins rhinopneumonie actuellement commercialisés sont recommandées par leur fabricant respectif, avec des programmes de vaccination qui varient selon la particularité du vaccin.

Les directives pour la production de vaccin vétérinaire sont données dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les directives données ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont de nature générales et peuvent être supplémentées par des directives nationale et régionale.

Au moins 16 vaccins contre la rhinopneumonie sont actuellement commercialisés par 5 fabricants, chacun contenant des permutations de l'EHV-1, l'EHV-4, et des deux sous-types du virus influenza équin.

Les indications cliniques formulées sur l'étiquette des vaccins rhinopneumonie disponibles sont les maladies respiratoires associées aux herpèsvirus, l'avortement, ou les deux. Seulement 4 vaccins produits ont satisfait aux conditions réglementaires d'efficacité requise en fournissant une protection contre les avortements dus à l'herpèsvirus dans des expériences de vaccination et d'inoculation de juments gestantes. Aucun des vaccins produits n'a démontré de façon définitive sa capacité à prévenir l'occurrence de maladie neurologique parfois associée avec une infection à l'EHV-1.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Le lot de semence primaire des virus (MSV) pour les vaccins rhinopneumonie doit être préparé à partir de souches de l'EHV-1 et/ou de l'EHV-4 qui ont été positivement et sans équivoque identifiées par des épreuves sérologique et génétique. Le lot de semence du virus doit être propagé dans une lignée cellulaire approuvée dans la production de vaccin équin par une agence de contrôle appropriée. Un enregistrement complet de la source d'origine, histoire des passages, milieu utilisé pour la propagation, etc., doit être gardé pour la préparation des lots de semence primaire des virus et des stocks cellulaires voulus pour leur utilisation dans la production de vaccin. Régulièrement, les stocks emmagasinés de MSV et de lot de semence primaire des cellules (MCS) utilisés pour la production de vaccin doivent être testés pour leur pureté et leur innocuité. Dans le cas des MSV, l'immunogénicité est aussi contrôlée. Généralement, le cinquième passage à partir de MSV et le vingtième passage à partir des MCS sont considérés comme les plus élevés prévus pour la production de vaccin. Les résultats de tous ces tests de contrôle de qualité sur les lots de semence primaire doivent être enregistrés et faire partie des données présentes dans les dossiers d'enregistrement.

b) Validation comme vaccin

i) Pureté

Les tests pour la pureté des lots de semence primaire comprennent des procédures prescrites qui démontrent que les stocks de lots de virus et de cellules ne contiennent pas de bactéries, de champignons, de mycoplasmes, et de virus étrangers. Des tests spéciaux doivent être réalisés pour confirmer l'absence d'artérovirus, du virus de l'anémie infectieuse équine, de l'influenza équin, d'herpèsvirus équin -2, -3, et -5, du rhinovirus équin, des alphavirus des encéphalomyélites équines, du virus de la maladie des muqueuses bovine (BVDV – contaminant fréquent des sérums bovins), et du parvovirus porcine (PPV – contaminant potentiel de la trypsine porcine). La vérification de la pureté doit aussi inclure l'exclusion de la présence de l'EHV-1 dans les lots de semence primaire du virus de l'EHV-4 et vice-versa.

ii) *Innocuité*

L'innocuité de chaque lot de MSV doit être testée chez des chevaux considérés comme sensibles au virus sauvage virulent, incluant les juments gestantes dans les 4 derniers mois de gestation, avant que les lots ne soient utilisés dans la préparation de vaccin vivant atténué contre la rhinopneumonie. L'innocuité du vaccin doit être démontrée par un test d'innocuité sur le terrain chez des chevaux d'âges différents provenant de 3 régions géographiques différentes. Les tests d'innocuité devraient être conduits par des vétérinaires indépendants utilisant un lot pré commercial de vaccin. L'innocuité des vaccins contre l'EHV-1 possédant une indication de protection envers l'avortement doit être testée sur un nombre significatif de juments gestantes en fin de gestation, utilisant le programme de vaccination qui sera recommandé par le fabricant pour le vaccin final.

iii) *Immunogénicité*

Les tests d'immunogénicité des stocks de MSV des EHV-1/4 doivent être réalisés sur des chevaux avec un vaccin expérimental préparé à partir du nombre de passage le plus élevé autorisé pour la production du vaccin. L'épreuve pour l'immunogénicité des MSV consiste en une vaccination des chevaux possédant un titre bas en anticorps contre les EHV-1/4, avec des doses de vaccin test qui seront recommandées dans le produit final étiqueté. Les seconds échantillons de sérum devraient être obtenus et testés pour la recherche d'une augmentation significative du titre en anticorps neutralisant contre le virus, 21 jours après la dernière injection.

iv) *Efficacité*

Une part importante de la procédure de validation est la capacité d'un lot de vaccin pré commercial contre la rhinopneumonie à fournir un niveau significatif de protection clinique envers les manifestations particulières de la maladie causée par une infection par les EHV-1/4 chez les chevaux, quand il est utilisé selon les conditions recommandées par le fabricant. Les données sérologiques ne sont pas acceptables pour établir l'efficacité des vaccins contre la rhinopneumonie. Les études d'efficacité doivent être conduites pour assurer une distribution aléatoire des animaux testés au sein du groupe, l'enregistrement des observations cliniques en aveugle, et l'utilisation d'un nombre suffisant d'animaux pour permettre l'évaluation statistique de l'efficacité dans la prévention ou la réduction de la maladie clinique spécifiée. Les études devraient être réalisées sur des vaccins expérimentaux entièrement formulés et (a) produits conformément à, (b) ayant le minimum (ou moins) d'activité antigénique spécifiée dans, et (c) produit avec le passage le plus élevé de MSV et de MCS permis par le « Guide de fabrication » approuvé (voir section C.2). L'efficacité du vaccin est démontrée par la vaccination d'un minimum de 20 chevaux sensibles aux EHV-1/4 possédant un titre en anticorps neutralisants ≤ 32 , suivi par une épreuve virulente sur des chevaux vaccinés et sur 10 chevaux témoin non vaccinés. L'étude de la vaccination et de l'épreuve virulente doit être réalisée sur un nombre identique de juments gestantes et évaluée en fonction de l'avortement si le vaccin est destiné à la prévention à l'aide dans la prévention des avortements causés par l'EHV-1.

2. Méthode de fabrication

Un protocole détaillé des méthodes de fabrication suivies doit être respecté pour la préparation des vaccins contre la RE. Il est approuvé, et classé comme guide de fabrication par l'agence de médicament appropriée. La spécificité des méthodes de fabrication des vaccins rhinopneumonie diffèrera avec le type (vivant ou inactivé) et la composition (EHV-1 seulement, EHV-4 et EHV-1, EHV-4 et le virus influenza équin, etc.) de chaque produit individuel, et aussi avec le fabricant.

3. Contrôles en cours de fabrication

Les cellules, les virus, le milieu de culture, et les suppléments d'origine animale ajoutés au milieu qui sont utilisés pour la production des lots de vaccins doivent être dérivés de stocks importants qui ont passé les tests prescrits en ce qui concerne la stérilité bactérienne, fongique, et l'absence de mycoplasme ; l'absence d'effet cancérigène ; et l'absence d'agent viraux extérieurs.

4. Contrôle des lots

Chaque lot de vaccin RE doit passer les tests de stérilité, d'innocuité, et d'activité immunogénique.

a) Stérilité

Des échantillons pris dans chaque lot de vaccin complet sont testés pour les contaminations par des bactéries, des champignons, et des mycoplasmes. Les procédures pour établir que le vaccin ne contient pas de virus étrangers sont aussi requises ; de tels tests doivent inclure l'inoculation d'une culture de cellules permettant la détection de virus équins communs, et aussi des techniques pour la détection du BVDV et du PPV dans les ingrédients d'origine animale utilisés dans la production des lots de vaccins.

b) Innocuité

Des tests pour assurer l'innocuité de chaque lot de vaccin RE doivent démontrer une inactivation complète du virus (pour les vaccins inactivés) ainsi qu'un niveau résiduel d'agent tuant les virus qui ne peut pas excéder la limite maximale permise (ex. 0,2 % pour le formol). Des tests d'innocuité sur des animaux de laboratoire sont aussi requis.

c) Activité

Le contrôle par lots de l'activité antigénique des vaccins contre l'EHV-1 peut être testé seulement en mesurant la capacité de différentes dilutions de vaccin à protéger des hamsters d'une infection avec une dose létale d'EHV-1 adapté au hamster. Cependant les tests d'activité sur la production en masse de vaccin RE peuvent aussi être réalisés par vaccination de chevaux sensibles suivie soit par une infection virale ou soit par un test de séroconversion. La disponibilité récente d'AcMs spécifiques du virus a permis le développement d'épreuves immunologiques *in vitro* moins coûteuses et plus rapides pour déterminer l'activité antigénique. La base pour de telles épreuves *in vitro* pour évaluer l'activité des vaccins contre la RE est la détermination, grâce à des AcMs spécifiques, de la présence dans chaque lot de vaccin d'antigène viral en quantité supérieure au minimum correspondant au niveau requis de protection (ou du taux de séroconversion) au cours d'un test d'activité.

d) Durée de l'immunité

Des tests pour établir la durée de l'immunité envers les EHV-1/4 obtenue par immunisation ne sont pas exigés pour chaque lot de vaccin. Les résultats de nombreuses observations rapportées indiquent que l'immunité induite par la vaccination envers les EHV-1/4 n'excède pas quelques mois ; ces observations sont reflétées par la fréquence de revaccination recommandée par la notice des vaccins RE.

e) Stabilité

Au moins 3 lots de vaccin doivent être testés pour la durée de conservation avant d'obtenir une conclusion sur la stabilité du vaccin. Lorsqu'ils sont stockés à 4 °C, les vaccins inactivés produits couramment conservent leur activité antigénique d'origine pendant au moins 1 an. Des préparations lyophilisées de vaccin vivant sont aussi stables durant 1 an quand elles sont stockées à 4 °C. Après reconstitution, les vaccins vivants ne sont pas stables et ne peuvent pas être stockés sans perte d'activité.

5. Contrôles du produit fini

Avant la délivrance pour l'étiquetage, l'emballage et la distribution commerciale, des fioles de produits vaccinaux finaux sélectionnées au hasard doivent être testées par des méthodes prescrites pour l'absence de contamination et la sécurité chez des animaux de laboratoire.

a) Innocuité

(Voir section C.4.b)

b) Activité

(Voir section C.4.c)

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALLEN G.P. & BRYANS J.T. (1986). Molecular epidemiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *In: Progress in Veterinary Microbiology and Immunology*, Vol. 2, Pandey R., ed. Karger, Basel, Switzerland & New York, USA, 78–144.
2. ALLEN G.P., KYDD J.H., SLATER J.D. & SMITH K.C. (1999). Recent advances in understanding the pathogenesis, epidemiology, and immunological control of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion. *Equine Infect. Dis.*, **8**, 129–146.
3. ALLEN G.P., KYDD J.H., SLATER J.D. & SMITH K.C. (2004). Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. *In: Infectious Diseases of Livestock*, Coetzer J.A.W., Thomson G.R. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, South Africa.
4. BORCHERS K. & SLATER J. (1993). A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J. Virol. Methods*, **45**, 331–336.

5. BRYANS J.T. & ALLEN G.P. (1988). Herpesviral diseases of the horse. *In: Herpesvirus Diseases of Animals*, Wittman G., ed. Kluwer, Boston, USA, 176–229.
6. CRABB B.S., MACPHERSON C.M., REUBEL G.H., BROWNING G.F., STUDDERT M.J. & DRUMMER H.E. (1995). A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. *Arch. Virol.*, **140**, 245–258.
7. CRABB B.S. & STUDDERT M.J. (1995). Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Adv. Virus Res.*, **45**, 153–190.
8. DUTTA S.K., TALBOT N.C. & MYRUP A.C. (1983). Detection of equine herpesvirus-1 antigen and the specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 1930–1934.
9. GUNN H.M. (1992). A direct fluorescent antibody technique to diagnose abortion caused by equine herpesvirus. *Irish Vet. J.*, **44**, 37–40.
10. LAWRENCE G.L., GILKERSON J., LOVE D.N., SABINE M. & WHALLEY J.M. (1994). Rapid, single-step differentiation of equid herpesvirus 1 and 4 from clinical material using the polymerase chain reaction and virus-specific primers. *J. Virol. Methods*, **47**, 59–72.
11. O'KEEFE J.S., JULIAN A., MORIARTY K., MURRAY A. & WILKS C.R. (1994). A comparison of the polymerase chain reaction with standard laboratory methods for the detection of EHV-1 and EHV-4 in archival tissue samples. *N.Z. Vet. J.*, **42**, 93–96.
12. SCHULTHEISS P.C., COLLINS J.K. & CARMAN J. (1993). Use of an immunoperoxidase technique to detect equine herpesvirus-1 antigen in formalin-fixed paraffin-embedded equine fetal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **5**, 12–15.
13. TELFORD E.A.R., WATSON M.S., MCBRIDE K. & DAVISON A.J. (1992). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology*, **189**, 304–316.
14. TELFORD E.A.R., WATSON M.S., PERRY J., CULLINANE A.A. & DAVISON A.J. (1998). The DNA sequence of equine herpesvirus 4. *J. Gen. Virol.*, **79**, 1197–1203.
15. THOMSON G.R., MUMFORD J.A., CAMPBELL J., GRIFFITHS L. & CLAPHAM P. (1976). Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Vet. J.*, **8**, 58–65.
16. VAN MAANEN C., VREESWIJK J., MOONEN P., BRINKHOF J. DE BOER-LUIJTZE E. & TERPSTRA C. (2000). Differentiation and genomic and antigenic variation among fetal, respiratory, and neurological isolates from EHV1 and EHV4 infections in The Netherlands. *Vet. Q.*, **22** (2): 88–93.
17. VARRASSO A., DYNON K., FICORILLI N., HARTLEY C.A., STUDDERT M.J. & DRUMMER H.E. (2001). Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.*, **79**, 563–569.
18. WAGNER W.N., BOGDAN J., HAINES D., TOWNSEND H.G.G. & MISRA V. (1992). Detection of equine herpesvirus and differentiation of equine herpesvirus type 1 from type 4 by the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.*, **38**, 1193–1196.
19. WELCH H.M., BRIDGES C.G., LYON A.M., GRIFFITHS L. & EDINGTON N. (1992). Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and cocultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.*, **73**, 261–268.
20. WHITWELL K.E., GOWER S.M. & SMITH K.C. (1992). An immunoperoxidase method applied to the diagnosis of equine herpesvirus abortion, using conventional and rapid microwave techniques. *Equine Vet. J.*, **24**, 10–12.

*

* *

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