

MALADIE DE LA FRONTIÈRE (« BORDER DISEASE »)

RÉSUMÉ

La maladie de la frontière, ou « Border disease » (BD), est une maladie virale des ovins décrite pour la première fois en 1959 dans la région frontalière (« border ») séparant l'Angleterre du Pays de Galles. Le virus est répandu dans le monde entier. Les taux de prévalence de la maladie de la frontière varient de 5 % à 50 % selon les pays et selon les régions d'un même pays. Stérilité des brebis, mortinatalité des agneaux et naissance d'agneaux chétifs constituent les principaux signes révélateurs de la maladie. Les agneaux malades peuvent présenter des tremblements, une conformation anormale et une toison hirsute : on les appelle « hairy-shaker » (trembleurs hirsutes) ou « fuzzy » lambs (agneaux crépus) et la maladie a parfois été désignée sous le nom « hairy shaker disease » (« maladie des trembleurs hirsutes »). La transmission verticale de la maladie joue un grand rôle dans l'épidémiologie de l'affection. L'infection des foetus peut entraîner la naissance d'agneaux infectés persistants (IP). Ces agneaux IP présentent une virémie, n'ont pas d'anticorps et excrètent du virus en permanence. Ce virus passe d'un ovin à l'autre, les animaux IP étant la source d'infection la plus grave. Les ovins peuvent également s'infecter à l'occasion d'un contact étroit avec des bovins excréteur le virus de la diarrhée virale bovine (« BVDV » en anglais), qui est très proche du virus de la BD.

Il est important de repérer les animaux virémiques IP, de façon à les écarter de la reproduction et de la commercialisation. Les épreuves sérologiques ne suffisent pas. On considère généralement que les ovins possédant des anticorps, mais non virémiques, ne présentent pas de danger, car les animaux guéris ne sont pas porteurs latents du virus.

Identification de l'agent pathogène : Le virus de la BD (« BDV » en anglais) est un Pestivirus de la famille des Flaviviridae étroitement apparenté au virus de la peste porcine classique et au BVDV. Pratiquement aucun isolat de BDV ne présente de pouvoir cytopathogène en culture cellulaire. Il n'existe pas de sérotypes définis, mais les isolats viraux présentent une diversité antigénique considérable, et 3 groupes antigéniques distincts ont été identifiés.

Des ovins IP ne présentant apparemment pas d'infection congénitale peuvent être repérés par isolement et immunocoloration en culture cellulaire de virus non-cytopathogène du sang ou du sérum. Les méthodes directes et rapides d'identification des ovins IP sont fondées sur la détection de l'antigène viral ou de l'ARN viral dans les leucocytes et sur la mise en évidence par immunohistochimie de l'antigène viral dans des biopsies cutanées. La mise en évidence du virus est moins fiable chez les agneaux âgés de moins de 2 mois qui ont ingéré des anticorps avec le colostrum. L'infection aiguë est généralement sub-clinique et la virémie est transitoire et difficile à détecter. L'isolement du virus à partir d'avortons ou d'agneaux mort-nés est difficile, tandis que les tissus d'ovins IP contiennent une grande quantité de virus qui peuvent être facilement isolés ou mis en évidence par des méthodes directes.

Épreuves sérologiques : La meilleure façon de confirmer une infection aiguë par le BDV est de démontrer une séroconversion chez plusieurs animaux d'un même groupe dont on aura récolté du sérum à 2 reprises ou plus. La technique immuno-enzymatique (ELISA) et le test de séroneutralisation virale sont les méthodes les plus courantes de recherche des anticorps.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : il n'existe pas de vaccin de référence de la BD, mais un vaccin à virus entier inactivé a été fabriqué et vendu. Dans l'idéal, ce vaccin devrait pouvoir être administré aux femelles avant la reproduction,

de façon à éviter les infections transplacentaires. L'emploi d'un vaccin hétérologue du BVDV a été proposé, mais il faut tenir compte de la diversité antigénique des virus de la BD.

Des virus de la BD ont contaminé plusieurs vaccins à virus modifiés vivants à usage vétérinaire qui avaient été produits sur cellules ovines ou en présence de sérum de mouton. Ce risque potentiel devrait être connu des fabricants de produits biologiques.

A. INTRODUCTION

Le virus de la maladie de la frontière (VBD) est un *Pestivirus* de la famille des *Flaviviridae* étroitement apparenté au virus de la peste porcine classique (« CSFV » en anglais) et au virus de la diarrhée virale bovine (« BVDV ») (21). Sur les 6 espèces de *Pestivirus* proposées, seules 4 sont officiellement reconnues, à savoir le CSFV, le BVDV types 1 et 2 et le BDV (1). Alors que les CSFV sont principalement inféodés au porc, les 3 autres virus ont été retrouvés chez les ovins, et plus particulièrement le BDV (27). A de rares exceptions près, pratiquement tous les isolats de BDV sont non-cytopathogènes (23). Le BDV se transmet naturellement entre ovins par voie oro-nasale et par transmission verticale. La BD est la principale maladie congénitale des ovins et des caprins, chez lesquels elle peut aussi entraîner des infections persistantes aiguës. Les ovins peuvent être infectés par les bovins (6). Les porcs peuvent également être infectés par le BDV et des anticorps contre ce virus peuvent entraîner des interférences lors du diagnostic de la peste porcine classique (15). Le présent chapitre traite de l'infection chez les ovins.

a) Infections aiguës

Les ovins adultes et nouveaux-nés exposés au BDV ne souffrent que d'une affection bénigne ou inapparente. Quatre à onze jours après leur contamination, les animaux présentent un peu de fièvre et une légère leucopénie, associées à une courte virémie et suivies de l'apparition d'anticorps circulants (19).

La meilleure façon de diagnostiquer les infections aiguës est de titrer les anticorps présents dans des sérums appariés prélevés chez un nombre représentatif d'ovins. L'infection par certains isolats de BDV peut entraîner une forte fièvre, une leucopénie sévère et prolongée, de l'anorexie, une conjonctivite, du jetage, de la dyspnée, de la diarrhée et une mortalité de 50 % chez les jeunes agneaux. En 1984, l'un de ces virus a été isolé au cours d'une sévère épizootie de BD chez des brebis laitières (7). Un second a contaminé un vaccin vivant de la peste porcine classique (29).

b) Infection du fœtus

Les principaux symptômes de la BD sont constatés chez les brebis gestantes. Alors que l'infection de la mère reste sub-clinique ou bénigne, ses conséquences sont graves pour le fœtus. Il peut mourir à n'importe quel stade de la gestation, mais le plus souvent à son début s'il a été infecté tôt. Les petits avortons peuvent être résorbés spontanément, ou être expulsés sans que l'on s'en aperçoive car les brebis continuent à manger normalement et ne semble pas souffrir. A l'approche de l'agnelage, on assiste à la mise-bas de fœtus plus gros ou d'agneaux mort-nés, ainsi qu'à la naissance d'agneaux faibles et de petite taille. La responsabilité du BDV dans un avortement ou une mortinatalité est souvent difficile à établir, bien que le virus puisse, dans certains cas, être isolé des enveloppes fœtales. Il est également possible de détecter le virus par immunohistochimie dans l'encéphale, la thyroïde ou d'autres organes des avortons (20). Les anticorps de la BD doivent aussi être recherchés dans le liquide des enveloppes foetales ou les sérums.

A l'agnelage, on constatera un nombre anormalement élevé de brebis stériles, mais ce sont les agneaux nés vivants et malades qui présenteront les symptômes les plus caractéristiques et les plus importants de BD. Les symptômes présentés par ces agneaux sont très variables et dépendent de la race d'ovins concernée, de la virulence de la souche de BDV et du moment où le troupeau a été infecté. Les agneaux atteints sont d'ordinaire petits et chétifs, beaucoup étant incapables de se tenir debout. Des symptômes nerveux ainsi que des anomalies de la toison sont souvent observés. Les symptômes nerveux restent les plus caractéristiques de la BD. Les tremblements vont de violentes contractions rythmiques des muscles du train et des membres postérieurs à des tremblements discrets et à peine perceptibles de la tête, des oreilles et de la queue. Les anomalies de la toison sont plus visibles chez les races à laine fine, qui présentent un pelage hirsute, en particulier au niveau de l'encolure et de la ligne du dos. Chez les agneaux atteints de BD, on peut aussi observer une pigmentation anormale, brune ou noire, de la toison laineuse. Les prélèvements de sang destinés à la recherche des anticorps du BDV seront effectués, sur anticoagulant, chez des agneaux suspects n'ayant pas encore ingéré de colostrum. Après ingestion de colostrum, il devient en effet difficile de détecter le virus avant que les agneaux aient atteint l'âge de 2 mois et que le titre de leurs anticorps maternels ait baissé. Toutefois, durant cette période, il reste possible de détecter l'antigène viral par immunohistochimie dans des biopsies cutanées et dans les leucocytes.

Si l'on prend grand soin d'eux, un certain nombre d'agneaux atteints de BD peuvent être élevés, même s'ils sont susceptibles de mourir à tout âge. Les symptômes nerveux régressent peu à peu, et peuvent disparaître à l'âge de 3 à 6 mois. Faiblesse et vacillation du train postérieur, ainsi que de légers tremblements de la tête, peuvent réapparaître à l'occasion d'un stress. Les agneaux malades grandissent souvent lentement et, dans les conditions naturelles, nombre d'entre eux mourront avant le sevrage. Lorsque les pertes sont faibles au moment de l'agnelage et lorsque les agneaux ne présentent pas de signes évidents de BD, ces dernières observations pourront constituer une première alerte.

Certaines infections du fœtus survenant à peu près en milieu de gestation peuvent aboutir à la naissance d'agneaux présentant de graves symptômes nerveux, des troubles de la locomotion et des anomalies du squelette. Ces agneaux souffrent d'une hypoplasie et d'une dysplasie cérébelleuse, d'hydrocéphalie et de porencéphalie consécutives à une nécrose inflammatoire. Ces lésions très destructrices semblent être d'origine immunitaire, et les agneaux présentant de telles lésions ont souvent un titre élevé d'anticorps dirigés contre le BDV. La plupart des agneaux infectés en fin de gestation sont normaux et sains, et naissent indemnes d'infection virale, mais porteurs d'anticorps du BDV. Certains d'entre eux peuvent rester chétifs et mourir jeunes (2).

c) Virémie persistante

Lorsque les fœtus survivent à une infection survenant avant l'acquisition de l'immunocompétence, ils naissent avec une virémie persistante. Le fœtus ovin peut répondre pour la première fois à un stimulus antigénique entre le 60^e et le 85^e jour de la gestation, qui dure 150 jours. Chez les fœtus infectés avant l'apparition de la compétence immunitaire, la réplication virale n'est pas maîtrisée et 50 % des fœtus en meurent ordinairement. Chez les agneaux qui survivent à une infection en début de gestation, le virus est retrouvé dans tous les organes. Ces agneaux semblent être tolérants au virus et souffrent généralement toute leur vie d'une infection persistante. Du sang prélevé avant la prise de colostrum contiendra du virus, mais pas d'anticorps contre ce virus. L'absence de réaction inflammatoire est caractéristique de la maladie, les altérations tissulaires les plus caractéristiques étant retrouvées au niveau du système nerveux central (SNC) et de la peau. Le déficit en myéline constaté dans tout le SNC, est à l'origine des symptômes nerveux. Au niveau de la peau, les follicules pileux primaires augmentent de taille alors que le nombre de follicules pileux secondaires diminue, ce qui entraîne un hérissément ou un épaississement de la toison.

Les sujets virémiques persistants peuvent être reconnus par isolement/détection du virus dans un prélèvement de sang. La virémie est toujours facile à détecter, sauf durant les 2 premiers mois de la vie, lorsque le virus est masqué par les anticorps colostraux ; cependant au cours de cette période, ce virus peut être tout de même retrouvé dans des leucocytes lavés. Certains de ces animaux développeront de faibles titres d'anticorps contre le BDV une fois âgés de plus de 4 ans (13). Bien qu'il soit difficile de détecter le virus dans le sang au cours d'une infection aiguë, la virémie persistante doit être confirmée par une seconde analyse, faite au plus tôt 3 semaines après la première.

Certains animaux virémiques survivent jusqu'à maturité sexuelle, et peuvent donc être utilisés pour la reproduction. Les agneaux nés de mères infectées resteront toujours virémiques. Ces sujets virémiques persistants représentent une source permanente de contagion pour les autres animaux et leur identification est donc très importante dans tout programme de contrôle de la maladie. L'absence de virémie doit être démontrée chez les animaux commercialisés.

Les béliers IP ont un sperme de mauvaise qualité et fortement contaminé, et ils sont peu fertiles. Tout bélier reproducteur doit faire l'objet d'une prise de sang qui permettra de rechercher une infection persistante éventuelle par le BDV. Le virus peut être également recherché dans le sperme, bien que l'isolement du virus y soit moins facile qu'à partir du sang du fait de la toxicité du sperme pour les cultures cellulaires. La transcription inverse couplée à une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) peut être intéressante pour détecter l'acide nucléique viral dans le sperme de certains béliers.

d) Maladie d'apparition retardée chez les ovins infectés virémiques persistants

Certains ovins IP, élevés séparément des autres animaux, sont atteints d'une diarrhée incoercible, dépérissent et présentent un jetage oculaire et nasal important parfois accompagné de détresse respiratoire. À l'autopsie de ces animaux, on découvre un épaississement très important de l'iléon distal, du caecum et du colon, consécutif à une entéropathie focale hypertrophique. Du BDV cytopathogène peut être isolé de l'intestin de ces agneaux. En l'absence de toute source extérieure connue de virus cytopathogène, il est très probable qu'il provienne d'un réservoir existant chez l'agneau lui-même. Les autres animaux appartenant au même groupe ne développent pas la maladie. Ce syndrome, qui a aussi été observé sur le terrain dans certains foyers de BD, ressemble en plusieurs points à celui de la diarrhée virale bovine (13).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Il n'y a pas de Laboratoire de référence de l'OIE pour la BD, mais les Laboratoires de référence de la diarrhée virale bovine et de la peste porcine classique peuvent donner des conseils (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). L'une des méthodes qui s'est avérée la plus sensible pour identifier le BDV reste l'isolement du virus. L'immunofluorescence directe ou les autres techniques immunohistochimiques sur coupes congelées, ainsi que la technique immuno-enzymatique (ELISA) et la RT-PCR sont également valables pour identifier les animaux infectés par le BDV.

a) Isolement du virus

Il est essentiel que les laboratoires qui entreprennent l'isolement du virus s'approvisionnent en cellules sensibles et en sérum de fœtus de veau garantis exempts de Pestivirus, ou leur équivalent, ces produits ne devant présenter ni activité pestivirale ni virus contaminant. Il est important que ces laboratoires soient sous assurance qualité.

Le virus peut être isolé sur de nombreuses cellules ovines, primaires ou secondaires, telles que cellules de reins, de testicules ou de poumons. Les lignées cellulaires ovines permettant la multiplication du BDV sont rares. Des lignées cellulaires semi continues, dérivées de muscle, de fœtus d'agneau, d'embryon complet (19) ou de plexus choroïde de mouton peuvent s'avérer utiles, mais la sensibilité de ces différentes lignées au BDV varie considérablement. Les cellules ovines ont été employées avec succès pour isoler ou multiplier les BDV et les BVDV de types 1 et 2 d'origine ovine. Dans les régions où les moutons ont pu être infectés par du BDV d'origine bovine, c'est un système d'isolement du virus utilisant à la fois des cellules ovines et bovines qui pourrait être le meilleur. Plusieurs cultures de cellules bovines peuvent être conseillées, notamment les cellules testiculaires, les cellules embryonnaires de trachée ou de cornets olfactifs, ou encore de lignées cellulaires continues de rein de bovin. Toutefois, les cellules bovines ne sont pas suffisamment sensibles pour isoler ou multiplier certains BDV, et c'est pourquoi il ne faut pas compter uniquement sur elles.

Le virus infectieux peut être recherché dans le sérum des animaux vivants, mais la méthode la plus sensible pour confirmer une virémie à *Pestivirus* est de laver au moins 3 fois leurs leucocytes dans le milieu de culture, où ces leucocytes seront ensuite co-cultivés pendant 5 à 7 jours avec des cellules sensibles. Ces cellules subissent un cycle de congélation-décongélation, et une partie aliquote est utilisée pour un nouveau passage sur des cellules sensibles cultivées sur lame porte-objet. Trois jours plus tard, ces cellules sont colorées, et la présence éventuelle de *Pestivirus* est recherchée par immunofluorescence ou test à la peroxydase. Les organes prélevés pour analyse sur l'animal mort doivent être placés dans un milieu de transport pour virus (10 % [poids/volume]). Au laboratoire, ces organes sont broyés, puis centrifugés pour éliminer les débris, et le surnageant est passé à travers un filtre de 0,45 µm. Les organes à partir desquels le virus est le plus facile à isoler sont la rate, la thyroïde, les reins, l'encéphale, les nœuds lymphatiques et les intestins.

La présence du BDV peut être recherchée dans le sperme, mais le sperme complet est fortement cytotoxique et doit donc être dilué dans le milieu de culture cellulaire, en général à 1/10 au moins. Sachant que le sperme infecté le plus dangereux est celui des béliers IP, il est plus sûr de prélever le sang de ces derniers que leur sperme pour les identifier. Il existe de nombreuses variantes possibles d'isolement du virus. Elles doivent toutes être optimisées pour atteindre leur sensibilité maximale, en utilisant une préparation virale de référence normalisée et, autant que possible, des isolats de BDV obtenus récemment du terrain. Une méthode pratique d'isolement du virus en tubes à essai est résumée ci-dessous :

- i) Des tapis de cellules ovines sensibles obtenus en tubes à essai, sub-confluentes ou juste confluentes, sont lavés au moins 2 fois dans une solution saline équilibrée de Hanks de façon à éliminer le milieu de culture avant de les inoculer avec 0,2 ml de prélèvement, adsorbé pendant 2 h à 37°C ;
- ii) Les cultures sont lavées avec 2 ml de milieu de culture. Ce dernier est rejeté et remplacé par 1 ml de milieu d'entretien ;
- iii) Les cultures sont incubées pendant 5 à 7 jours à 37°C. Elles sont examinées chaque jour au microscope, afin d'observer un effet cytopathogène (ECP) éventuel ;
- iv) Les tubes sont congelés à -70°C puis décongelés, comme précédemment, et leur contenu est transféré dans d'autres tubes à essai contenant des cultures sur lames ;
- v) Les cultures sur lames sont récupérées 3 à 4 jours plus tard, fixées par l'acétone froide pendant 15 min et colorées en vue d'une épreuve d'immunofluorescence directe ou indirecte. Les témoins indispensables sont des cellules non inoculées, et des cellules inoculées avec des souches de BDV cytopathogènes et non-cytopathogènes ;

- vi) Les cultures sur lames sont examinées sous un microscope à UV afin d'observer une éventuelle, fluorescence cytoplasmique diffuse, qui est caractéristique des *Pestivirus*.

Une autre possibilité est d'inoculer des cultures congelées et décongelées sur des tapis cellulaires obtenus sur lames et colorés en vue d'une épreuve par immunofluorescence directe, comme décrit ci-dessus. La coloration à l'immunopéroxydase peut aussi être utilisée avec des cellules multipliées sur des lames porte-objet, ou des cultures sur lamelles, ou des plaques de micro-titrage (voir ci-dessous la méthode de séroneutralisation virale [SN]). L'antigène viral peut également être recherché par la technique ELISA dans les cultures congelées et décongelées.

b) Immunohistochimie

La présence de l'antigène viral peut être démontrée dans la plupart des organes d'animaux IP (4, 20). Cette démonstration doit être faite à l'aide d'anticorps appropriés, appliqués sur des coupes à congélation de tissus fixées par l'acétone. Les organes qui contiennent une grande quantité d'antigène sont l'encéphale, la glande thyroïde et la muqueuse buccale. Les biopsies cutanées se sont révélées utiles pour le diagnostic *in vivo* des infections persistantes par le BDV.

c) Détection de l'antigène par ELISA

Le premier ELISA destiné à détecter un antigène pestiviral a été utilisé pour rechercher les ovins virémiques. Il a été modifié, depuis, en un double ELISA de capture par 2 anticorps monoclonaux, utilisable chez les ovins et les bovins. Deux anticorps monoclonaux de capture tapissent les puits d'une plaque de microtitrage et 2 autres anticorps monoclonaux, conjugués à la peroxydase, servent d'anticorps révélateurs (9). Cette épreuve est très couramment employée pour identifier les moutons virémiques IP, à partir de leucocytes lavés provenant de leur sang lysé par un détergent. La sensibilité de cette épreuve est proche de celle de l'isolement viral, et c'est une méthode pratique pour trier un grand nombre de prélèvements de sang. Comme dans le cas de l'isolement du virus, de hauts titres d'anticorps colostraux peuvent masquer une virémie persistante. En présence d'anticorps, l'ELISA est plus efficace que l'isolement viral, mais peut donner de faux résultats négatifs chez les agneaux virémiques âgés de moins de 2 mois. Généralement, l'ELISA n'est pas assez sensible pour détecter des infections aiguës par le BDV dans des prélèvements de sang. De même qu'il est utilisé pour détecter le virus dans les leucocytes, l'ELISA peut aussi être utilisé sur des suspensions d'organes, en particulier la rate, de moutons IP suspects comme il peut constituer une alternative aux épreuves d'immunofluorescence et d'immunopéroxydase sur cultures cellulaires. Plusieurs méthodes ELISA de détection des *Pestivirus* ont été décrites et des trousse de diagnostic permettant de détecter le BDV sont commercialisées. La validation de ces trousse est en cours.

d) Méthodes de reconnaissance de l'acide nucléique

Les séquences génomiques complètes de 2 BDV ont été déterminées et comparées à celle d'autres *Pestivirus* (3, 17). L'analyse phylogénétique montre que les BDV sont plus étroitement apparentés au CSFV qu'au BVDV (1, 22, 27). La RT-PCR est maintenant couramment utilisée pour le diagnostic des infections à *Pestivirus*. La méthode RT-PCR classique se réalise selon les étapes suivantes :

- i) L'ARN total est extrait par le phénol-chloroforme, le TRIZO et l'isothiocyanate de guanidine (GIT), ou par une colonne spin ;
- ii) L'ADNc est synthétisé en employant des hexamères randomisés ou des amorces antisens ;
- iii) Environ 25 cycles pour une première amplification par PCR nichée et 30 à 35 cycles pour la seconde amplification, sont nécessaires lorsque l'on utilise des amorces panpestivirus de la région non codante 5' ;
- iv) On utilise le système *TaqMan*, ou une autre sonde, pour identifier le produit pestiviral.

Le choix des amorces est crucial. Les amorces panpestivirus sont capables de détecter et de typer toutes les espèces de *Pestivirus* (18, 26). Des amorces spécifiques, permettant de reconnaître rapidement les virus de la BD, ont été également décrites (11, 28). Le recours à un seul tube de RT-PCR utilisant des amorces fluorescentes réduit le risque de contaminations croisées des prélèvements analysés (12). Un avantage important de cette méthode est de permettre la détection de l'ARN viral dans les organes du fœtus ou dans les cultures cellulaires utilisées pour produire les vaccins (25). La validation de la RT-PCR est en cours. Elle pourrait aussi s'avérer utile pour détecter des virus de la BD en dépit de la présence d'anticorps contre ce virus. Les précautions à prendre avec cette méthode ont été indiquées dans le Chapitre 1.1.4., « Validation et contrôle qualité des méthodes de réaction de polymérisation en chaîne utilisées pour le diagnostic de maladies infectieuses ».

2. Épreuves sérologiques

Les anticorps dirigés contre le BDV sont généralement détectés dans les sérums ovins par un test de séroneutralisation virale ou un ELISA. L'épreuve d'immunodiffusion en gélose peut aussi être utilisée, mais elle est moins sensible. Des témoins positifs et négatifs doivent être introduits dans toutes ces épreuves. Pour être considérés comme valides, les résultats de ces épreuves doivent être compris dans des limites prédéterminées. Pour déterminer la prévalence de la BD dans un troupeau, une région ou un pays, on peut ne faire qu'une prise de sang. En revanche, pour le diagnostic de la BD, des sérums prélevés en phase aiguë de la maladie ou lors de la convalescence sont les meilleurs pour confirmer une infection aiguë. Les sérums provenant du même animal doivent toujours être analysés côte à côte, sur la même plaque.

a) Test de séroneutralisation virale

Une souche cytopathogène standard (la souche Moredun, par exemple) peut être engagée dans le test de VN, réalisée sur des cellules de lignées semi-continues telles que la lignée FLM. Les grandes lignes du protocole de cette épreuve sont décrites ci-dessous :

- i) Les sérums à tester et les sérums témoins sont inactivés par chauffage durant 30 min à 56°C ;
- ii) A partir d'une dilution de départ au 1/4, les sérums à analyser subissent une dilution sériée de raison 2 dans le milieu de culture placé dans une plaque de micro-titrage pour culture cellulaire à fond plat de 96 puits. Selon la précision que l'on souhaite obtenir pour le test, 2 ou 4 puits sont utilisés pour chaque échantillon et pour chacune des dilutions. La gamme des dilutions peut aussi varier. Habituellement, on fait une première recherche d'anticorps sur des sérums dilués au 1/4 et on ne poursuit le titrage que sur ceux qui ont donné un résultat positif. Pour ce premier tri des sérums, il faut utiliser au moins 4 puits. Le volume de travail standard est de 25 µl : 25 µl du sérum dilué sont déposés dans chacun des puits ; 25 µl de milieu sont ajoutés à chacun des puits témoins situés en bas de la plaque de titrage et 25 µl de milieu contenant 100 DICT₅₀ (dose infectieuse 50 % pour la culture tissulaire) de virus sont ajoutés à chacun des puits situés en haut de cette plaque. Des sérums témoins positifs et négatifs doivent être prévus pour chaque épreuve, ainsi qu'un titrage du virus ;
- iii) Les plaques sont scellées avec un film ou un couvercle non toxiques, et incubées 1 h à 37°C ;
- iv) 100 µl d'une suspension cellulaire contenant 2×10^5 cellules/ml sont ajoutés à chaque puits. Le sérum de foetus de veau, ou le sérum équivalent utilisé pour favoriser la croissance cellulaire doit être exempt d'anticorps du BDV ;
- v) La plaque est à nouveau scellée ou incubée en chambre humide à 5 % de CO₂ durant 4 jours à 37°C ;
- vi) L'effet cytopathogène (ECP) éventuel est recherché au microscope. Si on observe un ECP dans les puits témoins des sérums à analyser, il sera dû à la toxicité. On pourra alors tenter des dilutions plus poussées de ces sérums toxiques, mais il sera peut-être impossible d'obtenir des résultats fiables avec certains sérums. Le titre de neutralisation virale de chaque sérum est exprimé par la dernière dilution à laquelle le virus a été neutralisé dans 50 % des puits, qui peut-être calculée en utilisant la méthode statistique de Spearman-Kärber. Le sérum d'un animal dit séronégatif ne neutralisera pas le virus à sa dilution la plus faible, c'est-à-dire au 1/4.

Le choix du virus d'épreuve est difficile du fait de la diversité antigénique des pestivirus (8, 14). On peut utiliser des souches standards de BDV cytopathogènes et de cellules bovines. Les résultats obtenus avec la souche Oregon C24V sont mieux corrélés à ceux obtenus avec la souche Moredun que ne le sont ceux obtenus avec la souche NADL. Il n'y a pas de souche idéale. C'est la souche locale qui donne le titre d'anticorps le plus élevé parmi des sérums d'ovins séropositifs qui doit être retenue. Le test de séroneutralisation virale peut aussi être réalisé avec des virus non-cytopathogènes, à condition de recourir, à partir de l'étape v) décrite ci-dessus, au système de coloration par l'immunopéroxydase décrit ci-après :

- i) Le milieu de culture est écarté et les puits sont lavés délicatement avec une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) tiède, puis séchés à l'air et refroidis à 4°C ;
- ii) Les puits sont fixés en ajoutant rapidement dans chacun d'entre eux de l'acétone diluée à 95 % dans l'eau et préalablement refroidi à -20°C. Les plaques sont maintenues 30 min à -20°C, et on ne doit pas les laisser empilées ni les laisser se réchauffer, car cela pourrait entraîner une imprégnation du plastique ;
- iii) L'acétone est écartée et les plaques sont séchées rapidement dans une pièce froide ;
- iv) 50 µl de sérum anti BDV sont ajoutés à tous les puits, à une dilution prédéterminée dans du PBS additionné de 1 % de Tween 80 (PBST). Les plaques sont incubées 30 min à 37°C en chambre humide ;

- v) Les plaques sont vidées et lavées 3 fois avec du PBST ;
- vi) Les puits sont vidés et un sérum anti-espèce approprié, conjugué à la peroxydase, y est ajouté à une dilution prédéterminée avant que les plaques soient remises 30 min à 37°C en chambre humide ;
- vii) Les plaques sont vidées et lavées 3 fois avec du PBST ;
- viii) Les plaques sont bien vidées et on y rajoute 50 µl de substrat activé, par exemple du 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC). La solution mère d'AEC est composée de 0,1 g d'AEC dissous dans 15 ml de diméthyl formamide. Pour l'emploi, ajouter 0,3 ml de la solution mère à 4,7 ml de tampon acétate 0,05 M à pH 5,0 filtré sur membrane, puis ajouter 5 µl de H₂O₂ à 30 %. NB: cette dernière solution est toxique et doit donc être manipulée avec précaution ;
- ix) Les plaques sont incubées à la température ambiante, et on recherche le développement éventuel d'une coloration rouge-brun caractéristique du cytoplasme cellulaire dans les puits témoins contenant du virus. Lorsque la coloration est achevée, le substrat est écarté délicatement et les puits sont bien lavés sous l'eau du robinet. Sans enlever cette eau des puits, les plaques sont examinées au microscope pour repérer ceux qui contiennent du virus ;
- x) Le titre de VN est calculé comme précédemment par la méthode de Spearman-Kärber ;
- xi) Il est aussi possible de réaliser l'épreuve en colorant directement avec un conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine.

Il peut être parfois nécessaire de savoir si les anticorps trouvés dans un troupeau sont dirigés contre un virus appartenant à une sérogruppe particulier de *Pestivirus*. Dans ce cas, on peut recourir à une épreuve de VN différentielle dans laquelle les sérums seront titrés contre des virus représentant chacun des 4 groupes de *Pestivirus*, à savoir le BDV, les BVDV types 1 et 2, et le CSFV. C'est vis-à-vis du sérotype infectant que le titre du sérum sera le plus élevé, et on aura par la même occasion une idée des réactions croisées existantes avec les autres sérotypes.

b) Méthode immuno-enzymatique

Un ELISA de capture par anticorps monoclonaux (AcM) permettant de titrer les anticorps dirigés contre le BDV a été décrit. Deux AcMs panpestivirus détectant différents épitopes de la protéine immunodominante non structurale NS 2/3 sont utilisés pour capturer l'antigène, obtenu sur culture cellulaire puis lysé par un détergent. Les résultats qualitatifs de l'ELISA sont bien corrélés à ceux du test de VN (10).

L'antigène est préparé de la façon suivante : utiliser 8 flacons de 225 cm² couverts d'un tapis confluent de cellules FLM ; 4 d'entre eux seront infectés, et les 4 autres conservés comme témoins. Laver les flacons et en inoculer quatre avec 0,01 à 0,1 m.o.i. (« multiplicity of infection ») de la souche cytopathogène de BDV Moredun. Laisser le virus s'adsorber durant 2 h à 37°C. Ajouter le milieu d'entretien additionné de 2 % de FBS (exempt d'anticorps du BDV), et incubé les cultures 4 à 5 jours jusqu'à ce que l'effet pathogène soit évident. Réaliser un mélange d'une part des surnageants des 4 flacons témoins et, d'autre part des surnageants des 4 flacons inoculés. Centrifuger à 3 000 **g** pendant 15 min pour mettre les cellules en culot. Ecarter les surnageants et conserver les culots cellulaires. Laver les flacons avec 50 ml de PBS et centrifuger comme dans l'étape précédente. Mélanger tous les culots de centrifugation dans 8 ml de PBS contenant 1 % de nonidet P40 et verser 2 ml de ce mélange dans chaque boîte témoin pour lyser les cellules encore attachées. Répéter l'opération pour les cellules infectées. Conserver les flacons à 4°C, pendant au moins 2 h, en agitant vigoureusement toutes les 30 min la petite quantité de liquide qui baigne les cellules pour les détacher complètement. Centrifuger l'antigène infecté et l'antigène témoin à 12 000 **g** pendant 5 min et les conserver à -70°C en petites aliquotes.

• Protocole

- i) Les 2 anticorps sont dilués à un titre prédéterminé (en général 1/4 000) dans un tampon bicarbonate 0,05 M à pH 9,6. Tous les puits d'une plaque ELISA de qualité micro-titrage (par exemple Nunc maxisorb, Greiner 129b) sont sensibilisés pendant une nuit à 4°C ;
- ii) Après avoir lavé 3 fois en PBST, une solution bloquante de PBST contenant 10 % de sérum de cheval (PBSTH) est ajoutée dans tous les puits, qui sont incubés 1 h à 37°C ;
- iii) L'antigène est dilué à un titre prédéterminé dans du PBSTH en rangées alternées de puits, sensibilisés soit avec l'antigène viral soit avec l'antigène témoin, pendant 1 h à 37°C. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois avec du PBST avant d'ajouter les sérums à titrer ;
- iv) Les sérums à titrer sont dilués à 1/50 en PBSTH et ajoutés à 2 puits sensibilisés avec le virus et à 2 autres puits sensibilisés avec l'antigène témoin, avec lesquels ils restent en contact pendant 1 h à 37°C. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois avec du PBST ;

- v) Une IgG anti-ovin conjuguée à la peroxydase est diluée à un titre prédéterminé en PBSTH et ajoutée à tous les puits, avec lesquels elle reste en contact 1 h à 37°C. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois avec du PBST.
- vi) Un substrat enzyme activé approprié, tel que de l'ortho-phénylène diamine (OPD) ou du bleu de tétraméthyl (TMB) est ajouté, en tenant bien compte des mises en garde du fabricant concernant la toxicité de ces produits. Après apparition de la coloration, la réaction est arrêtée par l'acide sulfurique et le résultat est lu sur un lecteur de plaques ELISA. La valeur moyenne d'absorption de 2 puits témoins est soustraite de celle de 2 puits contenant l'antigène viral de façon à obtenir la valeur d'absorption corrigée de chaque sérum. Les résultats sont exprimés en absorption corrigée par rapport à celle d'un sérum positif et d'un sérum négatif connus. Les titres ELISA peuvent également être extrapolés à partir de la courbe standard d'une série de dilutions d'un sérum positif de référence connu.

Si des antigènes d'une puissance suffisante peuvent être obtenus, l'étape de capture par les AcMs peut être omise. Dans ce dernier cas, les rangées alternées de puits sont sensibilisées avec de l'antigène viral et de l'antigène témoin dilués à un titre prédéterminé (en général 1/100) dans du tampon au bicarbonate 0,05 M de pH 9,6, et abandonnées toute une nuit à + 4°C. Les plaques sont lavées et la réaction est arrêtée comme à l'étape ii) précédemment décrite. Après lavage, on ajoute les sérums dilués et l'épreuve se poursuit comme à partir de l'étape iv décrite ci-dessus.

c) Épreuve d'immunodiffusion en gélose

L'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) a été utilisée pour la première fois pour démontrer la relation existante sur le plan immunologique entre les virus de la BD, de la BVD et de la CSF.

La souche Oregon C24V de BVDV cultivée sur cellules testiculaires a été utilisée pour détecter les anticorps de la BD chez le mouton. Un bon antigène peut être préparé à partir du milieu surnageant d'une culture cellulaire où se manifeste un premier ECP. Le milieu doit être concentré environ 100 fois par dialyse contre du polyéthylène glycol (PEG). Une autre possibilité est d'ajouter 8 % (poids/volume) de PEG 6000 à une suspension virus/cellules soumise aux ultra-sons. Après agitation toute une nuit à 4°C, le précipité est écarté par centrifugation 1 h à 1 800 g. Le surnageant est soigneusement décanté et le précipité est remis en suspension à 1 % dans de l'eau distillée jusqu'à atteindre le volume de la culture virus/cellules d'origine. Le précipité ainsi remis en suspension est centrifugé à 286 000 g pendant 2 h et le surnageant est soutiré pour servir d'antigène. Le précipité est écarté.

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

Pour être utile et éviter toute infection transplacentaire, un vaccin de la BD doit protéger les brebis avant leur entrée en période de reproduction. Des vaccins expérimentaux et commerciaux utilisant du BDV complet et inactivé ont été produits en Europe (5, 24).

Il a été démontré que les contaminants pestiviraux des vaccins modifiés à virus vivants pouvaient être à l'origine d'une maladie grave chez les porcs, les bovins, les ovins et les caprins auxquels ils avaient été administrés. Parmi les vaccins ainsi contaminés figurent ceux utilisés pour prévenir la maladie d'Aujeszky, la peste porcine classique, les rotaviroses, les coronaviroses, la peste bovine, la clavelée et l'ecthyma contagieux. La capacité insidieuse qu'ont les *Pestivirus* de traverser le placenta, et d'entraîner ainsi l'apparition d'individus IP, leur donne le pouvoir de contaminer les vaccins en infectant les cellules, le sérum ajouté aux milieux de culture ou les stocks de virus de semence. Du fait que presque tous les isolats de *Pestivirus* n'ont pas de pouvoir cytopathogène, ils restent ignorés à moins que des épreuves spécifiques soient mises en œuvre pour le détecter.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Un vaccin idéal doit contenir une ou des souches de virus capables de protéger contre tous les *Pestivirus* ovins. La démonstration a été faite récemment que 3 groupes de *Pestivirus* antigéniquement distincts infectent les ovins. L'un de ces groupes est représenté par la souche de référence du BDV Moredun ; le deuxième groupe comprend des virus similaires à la majorité des souches bovines de BVDV (BVDV type 1) ; et le troisième groupe comprend les souches les moins communes de BVDV (type 2) (30). Des expériences de protection croisée sont nécessaires pour mieux comprendre la signification de ces constatations. Quoiqu'il en soit, il semblerait que tout vaccin de la BD doive contenir au moins un représentant du groupe des BDV et un du groupe des BVDV (type1). La caractérisation de virus vaccins biologiquement clonés doit se faire par typage à l'aide d'anticorps monoclonaux, ou par génotypage (16).

b) Méthode de culture

Différentes cellules de ruminants peuvent être utilisées. La production optimale dépend du type de cellules et de l'isolat utilisé. Un vaccin commercial de la BD contenant 2 souches de virus a été préparé sur des cellules ovines de lignée continue (5). Les cellules doivent être produites à partir d'un lot de semence provenant lui-même d'un lot de cellules primaires (MCS, *Master Cell Seed*) dans laquelle l'absence totale de micro-organismes contaminants a été démontrée. Un vaccin ne doit être produit que sur des cellules ayant subi moins de 20 passages à partir du MCS. Un contrôle des cellules doit être effectué à chacun de ces passages pour vérifier leur absence de contamination par les *Pestivirus*.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Tous les vaccins doivent satisfaire aux tests normalisés d'innocuité et d'efficacité. Le test d'innocuité des vaccins à BDV inactivés doit comprendre la recherche d'une contamination éventuelle de tous les ingrédients du vaccin par les *Pestivirus*.

Les tests d'efficacité des vaccins de la BD doivent démontrer la capacité qu'ont ces derniers de prévenir une diffusion du virus par voie transplacentaire. L'épreuve virulente de brebis gestantes vaccinées a été réalisée à 50-60 jours de gestation par inoculation intranasale de virus, ou en les mettant en contact avec des moutons IP (5).

2. Méthode de fabrication

Des vaccins à virus inactivés ont été fabriqués en employant des techniques de laboratoire conventionnelles sur cultures cellulaires stationnaires ou en flacons roulants. Les virus étaient inactivés par le formol ou la bêta-propiolactone. Les adjuvants étaient constitués par de l'hydroxyde d'aluminium ou de l'huile (5, 24).

3. Contrôles durant la fabrication

Les cultures doivent être examinées quotidiennement, pour s'assurer qu'elles sont indemnes de contamination bactérienne visible et que le seul ECP observé correspond à celui du virus en culture. Aucun ECP ne doit être observé dans les cultures utilisées pour propager des souches non-cytopathogènes de virus.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et de vérification de l'absence des contaminants pour les produits biologiques figurent au Chapitre 1.1.5., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

L'absence de virus viables doit être rigoureusement vérifiée dans les échantillons de vaccins à virus inactivés. Ces échantillons doivent être propagés plusieurs fois sur cellules sensibles pour s'assurer de l'absence de BDV vivant. A cet examen *in vitro*, le test d'innocuité normalisée peut ajouter l'injection à 2 moutons, sans anticorps contre le BDV, de 20 doses d'antigène brut. La présence de virus vivant parmi ces doses se traduira par une réponse sérologique plus importante que celle attendue après l'injection du seul virus inactivé. Les anticorps contre d'autres agents potentiellement contaminants peuvent aussi être recherchés dans les sérums de ces 2 moutons.

c) Activité

L'activité du vaccin peut être également vérifiée sur des moutons séronégatifs, chez lesquels on surveille l'apparition et le titre des anticorps. Le titre infectieux du virus avant son inactivation mesure indirectement l'activité du vaccin. La teneur en antigène après inactivation du virus peut être mesurée en réalisant un ELISA de capture par les AcMs, corrélée ensuite aux résultats d'un test connu d'activité *in vivo*. Comme cela est recommandé pour mesurer l'activité des vaccins de la BVD chez les bovins, il faut démontrer que le vaccin peut prévenir la transmission transplacentaire du BDV chez les femelles gestantes.

d) Durée de l'immunité

On ne sait rien de la durée de l'immunité post-vaccinale. Il est peu probable que l'injection de vaccins à virus inactivés entraîne l'apparition d'un niveau d'immunité durable et des rappels annuels sont probablement nécessaires après 2 ou 3 injections de primo-vaccination. Il n'y a pas assez de résultats disponibles pour savoir si une corrélation existe entre le taux d'anticorps de la mère et la protection de son fœtus.

e) Stabilité

On sait peu de choses de la stabilité des vaccins de la BD. Les vaccins à virus inactivés devraient avoir une durée de conservation de 1 an au moins, à condition d'être protégés de la lumière et conservés à 4°C.

f) Agents de conservation

Des agents de conservation peuvent être ajoutés dans les flacons de vaccins multidoses, si les autorités de contrôle en sont d'accord.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Le BDV n'est pas considéré comme présentant un risque pour la santé humaine. La manipulation du virus se fera en respectant les bonnes pratiques normalisées de microbiologie.

5. Contrôles sur le produit fini

a) Innocuité

Test *in vitro* uniquement.

b) Activité

Vérification de la valeur antigénique *in vitro*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AVALOS-RAMIREZ R., ORLICH M., THIEL H.-J. & BECHER P. (2001). Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology*, **286**, 456–465.
2. BARLOW R.M. & PATTERSON D.S.P. (1982). Border disease of sheep: a virus-induced teratogenic disorder. *Adv. Vet. Med. (Suppl. J. Vet. Med.)*, **36**, 1–87.
3. BECHER P., ORLICH M. & THIEL H.-J. (1998). Complete genomic sequence of border disease virus a pestivirus from sheep. *J. Virol.*, **72**, 5165–5173.
4. BRAUN U., HILBE M., EHRENSPERGER F., SALIS F., ALTHER P., STRASSER M., STALDER H.P. & PETERHANS E. (2002). Border Disease in einem Schafbetrieb. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **144**, 419–426.
5. BRUN A., LACOSTE F., REYNAUD G., KATO F. & SAINT-MARC B. (1993). Evaluation of the potency of an inactivated vaccine against border disease pestivirus infection in sheep. *In: Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses*, Edwards S., ed. Fondation Marcel Merieux, Annecy, France, 1–3 October 1992, 257–259
6. CARLSSON U. (1991). Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, **128**, 145–147.
7. CHAPPUIS G., BRUN A., KATO F., DAUVERGNE M., REYNAUD G. & DURET C. (1986). Etudes serologiques et immunologiques réalisées à la suite de l'isolement d'un pestivirus dans un foyer ovine chez des moutons de L'Aveyron. *In: Pestiviruses des Ovins et des Bovins*, Espinasse J. & Savey M. eds. Ste Française de Buiatrie, Paris, France, **55**, 66.
8. DEKKER A., WENSVOORT G. & TERPSTRA C. (1995). Six antigenic groups within the genus pestivirus as identified by cross-neutralisation assays. *Vet. Microbiol.*, **47**, 317–329.
9. ENTRICAN G., DAND A. & NETTLETON P.F. (1994). A double monoclonal-antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. *Vet. Microbiol.*, **43**, 65–74.
10. FENTON A., SINCLAIR J.A., ENTRICAN G., HERRING J.A. & NETTLETON P.F. (1991). A monoclonal antibody capture ELISA to detect antibody to border disease virus in sheep sera. *Vet. Microbiol.*, **28**, 327–333.
11. FULTON R.W., D'OFFAY J.M., SALIKI J.T., BURGE L.J., HELMAN R.G., CONFER A.W., BOLIN S.R. & RIDPATH J.F. (1999). Nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for typing ruminant pestiviruses: bovine viral diarrhoea viruses and border disease virus. *Can. J. Vet. Res.*, **63**, 276–281.

12. MCGOLDRICK A., BENSAUDE E., IBATA G., SHARP G. & PATON D.J. (1999). Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *J. Virol. Methods*, **79**, 85–95.
13. NETTLETON P.F., GILMOUR J.S., HERRING J.A. & SINCLAIR J.A. (1992). The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. *Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis.*, **15**, 179–188.
14. NETTLETON P.F., GILRAY J.A., RUSSO P. & DLISSI E. (1998). Border disease of sheep and goats *Vet. Res.*, **29**, 327–340.
15. OGUZOGLU T.C., FLOEGEL-NIESMANN G., FREY H.R. & MOENNIG V. (2001). Differential diagnosis of classical swine fever and border disease: seroepidemiological investigation of a pestivirus infection on a mixed sheep and swine farm. *Dtsch Tierarztl. Wochenschr.*, **108**, 210–213.
16. PATON D.J., SANDS J.J., LOWINGS J.P., SMITH J.E., IBATA G. & EDWARDS S. (1995). A proposed division of the pestivirus genus into subgroups using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralization assays and genetic sequencing. *Vet. Res.*, **26**, 92–109.
17. RIDPATH J.F. & BOLIN S.R. (1997). Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. *Virus Res.*, **50**, 237–243.
18. SANDVIK T., PATON D.J. & LOWINGS P.J. (1997). Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of the 5' untranslated cDNA region. *J. Virol. Methods*, **64**, 43–56.
19. THABTI F., FRONZAROLI L., DLISSI E., GUIBERT J.M., HAMMAMI S., PEPIN M. & RUSSO P. (2002). Experimental model of border disease virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. *Vet. Res.*, **33**, 35–45.
20. THUR B., HILBE M., STRASSER M. & EHRENSPERGER F. (1997). Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 1371–1375.
21. VAN REGENMORTEL M.H.V., FAUQUET C.M. & BISHOP D.H.L. (2000). Virus taxonomy. *In: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International committee on taxonomy of viruses : Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 867–872.
22. VAN RIJN P.A., VAN GENNIP H.G.P., LEENCLERSE C.H., BRUSCHKE C.J.M., PATON D.J., MOORMANN R.J.M. & VAN OIRSCHOT J.T. (1997). Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2 *Virology*, **237**, 337–348.
23. VANTSIS J.T., BARLOW R.M., FRASER J. & MOULD D.L. (1976). Experiments in border disease VIII. Propagation and properties of a cytopathic virus. *J. Comp. Pathol.*, **86**, 111–120.
24. VANTSIS J.T., RENNIE J.C., GARDINER A.C., WELLS P.W., BARLOW R.M. & MARTIN W.B. (1980). Immunisation against Border disease. *J. Comp. Path.*, **90**, 349–354.
25. VILCEK S. (2001). Identification of pestiviruses contaminating cell lines and fetal calf sera. *Acta Virol.*, **45**, 81–86.
26. VILCEK S., HERRING A.J., HERRING J.A., NETTLETON P.F., LOWINGS J.P.L. & PATON D.J. (1994) Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.*, **136**, 309–323.
27. VILCEK S., NETTLETON P.F., PATON D.J. & BELAK S. (1997). Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J. Gen. Virol.*, **78**, 725–735.
28. VILCEK S. & PATON D.J. (2000). A RT-PCR assay for the rapid recognition of border disease virus. *Vet. Res.*, **31**, 437–445.
29. WENSVOORT G. & TERPSTRA C. (1988). Bovine viral diarrhoea virus infection in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated virus. *Res. Vet. Sci.*, **45**, 143–148.
30. WENSVOORT G., TERPSTRA C. & DE KLUYVER E.P. (1989). Characterisation of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralisation. *Vet. Microbiol.*, **20**, 291–306.

*

* *